



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INVESTIGAÇÃO NOSOLÓGICA DE DIARREIAS NEONATAIS INDIFERENCIADAS EM
VITELOS NO CONCELHO DE ODEMIRA

DAVID RAFAEL FIGUEIREDO MARTINS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Miguel Luís. Mendes Saraiva Lima

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Dr. Nuno Miguel Gonçalves Parreira Raposo

ORIENTADOR

Dr. Nuno Miguel Gonçalves Parreira Raposo

CO-ORIENTADOR

Doutor Virgílio da Silva Almeida

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

INVESTIGAÇÃO NOSOLÓGICA DE DIARREIAS NEONATAIS INDIFERENCIADAS EM
VITELOS NO CONCELHO DE ODEMIRA

DAVID RAFAEL FIGUEIREDO MARTINS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutor Miguel Luís. Mendes Saraiva Lima

Dr. Nuno Miguel Gonçalves Parreira Raposo

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutor Virgílio da Silva Almeida

CO-ORIENTADOR

Dr. Nuno Miguel Gonçalves Parreira Raposo

Doutor Virgílio da Silva Almeida

2011

LISBOA

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Nuno Raposo por me ter acolhido nesta derradeira fase da conclusão do meu percurso académico. Foram 6 meses de trabalho que me deram muita da bagagem que hoje carrego comigo. A ele, um Muito Obrigado;

Ao Dr. Rui Silva, que não sendo o meu orientador, me proporcionou igualmente bons momentos de sabedoria;

À Dra. Ana Raposo, pelos conhecimentos transmitidos e cimentados na clínica de animais de companhia;

Ao meu co-orientador Professor Doutor Virgílio da Silva Almeida pelas ideias, correcções e orientações que me forneceu;

À Professora Doutora Maria Constança Ferreira Pomba, pela ideia dos kits que se revelou fundamental no desenvolvimento deste estudo;

Ao laboratório BioX, particularmente à Annita Ginter que gentilmente me forneceu os kits de diagnóstico essenciais a este estudo

Aos meus pais, porque durante toda a minha educação me souberam transmitir os valores correctos para ser a pessoa que sou hoje. Pelo amor e amizade que sempre me proporcionaram. Para eles não existem palavras suficientes para agradecer!

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, aconselhando e motivando para que este percurso se tornasse ainda mais agradável;

À Sara, por me aturar nos meus momentos menos bons, por sempre saber o que dizer quando mais precisava e por estar sempre ao meu lado...a ti, um obrigado especial;

A todos aqueles que eu, injustamente, não tenha incluído nos agradecimentos anteriores!

Resumo

As diarreias neonatais são fonte importante de comprometimento de performance dos vitelos. Ainda que a sua principal consequência seja o atraso no desenvolvimento, em casos extremos podem ser fatais. Existem várias etiologias para a síndrome diarreia, sendo que estas surgem muitas vezes associadas no mesmo vitelo. Neste sentido foi calculada a frequência dos quatro agentes etiológicos mais comuns no concelho de Odemira: *Escherichia coli* F5, o *Cryptosporidium* spp, o Coronavírus e o Rotavírus. Para tal foram usados *kits* comerciais de imunocromatografia lateral em 33 amostras de fezes de vitelos diarreicos. A *E. coli* F5 foi detectada em 12,1% das amostras analisadas (n=4), o *Cryptosporidium* spp em 66,7% (n=22), o Rotavírus em 48,5% (n=16) e o Coronavírus em 24,2% (n=8). Neste estudo, as co-infecções resultaram da presença de pelo menos um dos vírus associado à *E. coli* F5 ou ao *Cryptosporidium* spp. Não foram encontradas co-infecções por *E. coli* e *Cryptosporidium* spp. O concelho de Odemira revela uma contaminação elevada de oocistos de *Cryptosporidium* spp, possivelmente devido às suas condições edafoclimáticas. A frequência detectada de *E. coli* F5 foi baixa na amostra da população de vitelos investigada e os vírus parecem exibir um comportamento oportunista, a julgar pela elevada frequência em que identificámos co-infecções.

Palavras-chave: vitelo, diarreia, *Cryptosporidium* spp, *Escherichia coli* F5, coronavírus, rotavírus, *kits* de diagnóstico.

Abstract

Neonatal diarrhoea in calves is an important source of productivity impairment. Although its main consequence is a transitory reduction on the feed conversion ratio and consequently on the young stock live weight gain, in extreme cases it can be fatal. It is a multifactorial disease that can be caused by several pathogens, some of them occurring simultaneously in the same animal.

The frequency of neonatal diarrhoea in calves was estimated for four enteropathogens at the council of Odemira, Portugal: *Escherichia coli* F5, *Cryptosporidium* spp, coronavirus and rotavirus. To accomplish this goal a commercial lateral flow diagnosis kit was used on 33 faeces samples of *diarrheic calves*.

Cryptosporidium spp was detected in 66.7% (n=22) of the analysed samples, rotavirus in 48.5% (n=16), coronavirus in 24.2% (n=8) and *E. coli* F5 in 12.1% (n=4).

Co-infections involved at least one virus associated with *E. coli* F5 or *Cryptosporidium* spp. There were no co-infections with *E. coli* F5 and *Cryptosporidium* spp. Odemira council reveals a high contamination of *Cryptosporidium* spp oocysts, probably due to its edaphoclimatic conditions. The *E. coli* F5 frequency was low in the investigated sample and both viruses displayed an opportunistic behaviour judging by the high frequency of co-infections identified in this study.

Keywords: Calf, diarrhoea, *Escherichia coli* F5, *Cryptosporidium* spp, coronavirus and rotavirus, diagnostic kits.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
Índice Geral.....	xiii
Índice de Figuras.....	xv
Índice de Tabelas.....	xv
Índice de gráficos.....	xv
Índice de Abreviaturas.....	xvi

I – Relatório de Estágio 1

1. Caracterização do concelho de Odemira.....	1
2. Descrição das actividades realizadas no âmbito da sanidade animal.....	1
3. Descrição das actividades realizadas no âmbito da área clínica	3

II - Revisão Bibliográfica 7

1. Síndrome diarreia.....	7
2. Etiologia	7
2.1. <i>Cryptosporidium</i>	7
2.1.1. Epidemiologia	8
2.1.2. Ciclo de vida	10
2.1.3. Fisiopatologia.....	11
2.1.4. Diagnóstico	13
2.1.5. Tratamento.....	13
2.2. Coronavírus	14
2.2.1. Epidemiologia	15
2.2.2. Replicação	16
2.2.3. Fisiopatologia.....	18
2.2.4. Diagnóstico	18
2.2.5. Tratamento.....	19
2.3. Rotavírus.....	19
2.3.1. Epidemiologia	20
2.3.2. Replicação	22
2.3.3. Fisiopatologia.....	23
2.3.4. Diagnóstico	24
2.3.5. Tratamento.....	25
2.4. <i>Escherichia coli</i>	25
2.4.1. Epidemiologia	27
2.4.2. Fisiopatologia.....	28
2.4.3. Diagnóstico	30
2.4.4. Tratamento.....	31

III - Tema: INVESTIGAÇÃO NOSOLÓGICA DE DIARREIAS NEONATAIS INDIFERENCIADAS EM VITELOS NO CONCELHO DE ODEMIRA 32

1. Objectivos	32
2. Material e métodos.....	32
2.1. Animais-alvo	32
2.2. Colheita de amostras biológicas.....	32
2.3. Diagnóstico laboratorial.....	33
2.3.1. Protocolo de procedimentos do imunoensaio.....	34
2.3.2. Análise estatística exploratória.....	35

3. Resultados	36
4. Discussão	39
5. Conclusões	43
IV - Bibliografia	45

Índice de Figuras

Figura 1 – Pormenor da bexiga de um vitelo suspeito de Leptospirose.....	4
Figura 2 – Vitelo recém nascido.....	4
Figura 3 – Parto de uma cabra anã.....	5
Figura 4 – Vacinação de um pónei.....	6
Figura 5 – Ciclo do <i>Cryptosporidium</i> spp.....	11
Figura 6 – Virião de Coronavírus	15
Figura 7 – Replicação dos Coronavírus	17
Figura 8 – Virião de Rotavírus.....	20
Figura 9 – Factores de virulência da <i>E. coli</i> ETEC	26
Figura 10 – Esquema exemplificativo da patogénese da <i>E. coli</i> ETEC	29
Figura 11 – Interpretação do Kit TETRASTRIPS BIO K 156	34
Figura 12 – Posicionamento das tiras	35

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Especificações do kit TETRASTRIPS BIO K 156.....	33
Tabela 2 – Relação entre agentes em co-infecções	38

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Casuística observada durante o estágio, por espécies.....	3
Gráfico 2 – Casos clínicos observados em bovinos, por sistema orgânico.	5
Gráfico 3 – Casos clínicos observados em pequenos ruminantes, por motivo de consulta. ..	5
Gráfico 4 – Casos clínicos observados em suínos, por sistema orgânico.	6
Gráfico 5 – Recolha de amostras por mês do ano	33
Gráfico 6 – Distribuição de frequências dos agentes pesquisados.....	36
Gráfico 7 – Infecções por 1 agente	36
Gráfico 8 – Co-infecções por agente.....	37
Gráfico 9 – Infecções e co-infecções envolvendo coronavírus.....	37
Gráfico 10 – Infecções simples e co-infecções envolvendo rotavírus.....	38
Gráfico 11 – Infecções envolvendo três agentes etiológicos	38

Índice de abreviaturas

5-HT – 5-hidroxitriptamina

BCoV – Coronavírus bovino

Ca_2^+ – Ião cálcio

cAMP – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CFRT – Regulador transmembranar da fibrose quística

Cl^- – Ião Cloro

DRA – Direcção Regional de Agricultura

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EUA – Estados Unidos da América

GGC – Guanilil Ciclase C

GKIIc – Proteína quinase dependente de GMPc

GMPc – Guanosina monofosfato cíclica

HCO_3^- – Ião bicarbonato

LT – Enterotoxina termolábil

NaCl – Cloreto de sódio

NTZ – Nitazoxanida

ON – Monóxido de Azoto

OPP – Organização de Produtores de Pecuária

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PGE_2 – Prostaglandina E_2

PGI_2 – Prostaglandina I_2

PNSA – Programa Nacional de Saúde Animal

RE – Retículo Endoplasmático

RT-PCR – *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*

SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida desnaturada pelo dodecil sulfato de sódio

SGLT – Proteína transportadora Sódio-Glucose

ST – Enterotoxina termoestável

STa – Enterotoxina termoestável a

STb – Enterotoxina termoestável b

VIP – Péptido Vasoactivo Intestinal

I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio curricular foi realizado durante os meses de Novembro de 2009 a Abril de 2011, na empresa “Vetttotal”, em São Teotónio, Odemira, sob a orientação do Dr. Nuno Raposo. Acompanhei também por algumas vezes o outro sócio da “Vetttotal”, o Dr. Rui Silva, que acompanhava mais as explorações leiteiras. As actividades praticadas abrangeram todo o concelho de Odemira e cheguei a acompanhar e colaborar em consultas noutros concelhos.

1. Caracterização do concelho de Odemira

O concelho de Odemira está inserido no distrito de Beja. Tem por limites, a norte os municípios de Sines e Santiago do Cacém, a este Ourique e a sul e sudoeste, os concelhos algarvios de Aljezur, Monchique e Silves. É caracterizado por uma imensa diversidade paisagística, compreendida entre a planície, a serra e o mar, num total de 1720,25 km². Em área, é o maior concelho de Portugal, apesar de a sua população ser de apenas 26 mil habitantes. A maior parte desta área está em contacto com água, seja pela frente marítima de 55 km ou do rio Mira e da barragem de Santa Clara e de todos os seus canais.

2. Descrição das actividades realizadas no âmbito da sanidade animal

As Organizações de Produtores de Pecuária (OPP) são parceiros privados de eleição no controlo das doenças infecto-contagiosas, realizando visitas regulares às explorações das espécies bovinas e de pequenos ruminantes e dando cumprimento às normas reunidas no Programa Nacional de Saúde Animal (PNSA). O seu principal objectivo é colaborar activamente na erradicação da Tuberculose, da Brucelose, da Leucose Enzoótica Bovina e da Língua Azul (ou Febre Catarral Ovina) em bovinos e na Brucelose e na Língua Azul nos pequenos ruminantes, alcançando deste modo o melhor estatuto sanitário, de acordo com a Portaria Nº 178/2007 de 09 de Fevereiro.

A tuberculose e a brucelose são alvo de programas oficiais de erradicação por representarem ameaças para saúde humana e por serem obstáculo à optimização da produtividade e à livre circulação de animais e de produtos de origem animal. Estes programas têm como principal meta a criação progressiva de efectivos e áreas geográficas livres ou indemnes, que exigem vários níveis de intervenção. A Leucose Enzoótica Bovina é apenas alvo dum programa de controlo por não se tratar de uma zoonose e por a doença estar sobretudo circunscrita a alguns solares de raças autóctones, nos quais uma estratégia de “teste e abate dos seropositivos” poderia inviabilizar a sobrevivência dessas raças.

Além disso, as OPP exercem um importante papel informativo e pedagógico perante os seus associados.

Segundo a Portaria n.º 122/2003 de 5 de Fevereiro as acções de profilaxia médica e sanitária a realizar pelas OPP devem ser integradas num Plano Sanitário anual, do qual constem as acções sanitárias a executar pelas OPP, detalhadas por espécie, de acordo com os planos de erradicação em vigor e baseadas na classificação sanitária dos efectivos e das regiões.

Resumindo, a acção do médico veterinário das OPP abrange nos bovinos:

- A colheita anual de sangue para rastreio serológico da brucelose (animais maiores de 12 meses, leucose enzoótica (animais maiores de 24 meses) e peripneumonia contagiosa dos bovinos (a 10% dos animais saneados - epidemiovigilância);
- A identificação de todo o efectivo através de marcadores auriculares individuais;
- Teste de tuberculinização anual. Este é feito através da inoculação intradérmica das tuberculinas aviária e bovina no terço médio da tábua do pescoço (método duplo), com leitura da reacção após 72 horas;
- Vacinação para a Língua Azul;
- A desparasitação depende de decisão da própria organização da OPP, não é obrigatória por lei.

Nos rebanhos de pequenos ruminantes as actividades abrangidas são as seguintes:

- A identificação de todo o efectivo através de marcas auriculares individuais;
- A colheita de sangue para rastreio serológico da brucelose. Em rebanhos até 50 animais todo o efectivo tem que ser rastreado. Em efectivos com número de animais superior a 50 serão rastreadas 25% das fêmeas reprodutoras e todos os machos de idade superior a 6 meses;
- A vacinação para a Língua Azul;
- A desparasitação anual dos animais é facultativa.

Registos de todas as acções, realizadas quer em bovinos quer em pequenos ruminantes, em documentos próprios a armazenar, validar, analisar e disponibilizar em relatórios periódicos.

As suiniculturas, embora não abrangidas pelo associativismo das OPP, são desde Outubro de 2008 obrigadas a vacinar contra a Doença de Aujeszky no âmbito do Programa de Erradicação da Doença de Aujeszky. Esta vacinação é efectuada pelos Médicos Veterinários Responsáveis sanitários nas suiniculturas industriais e contratados pelo proprietário nas restantes explorações. Para ser efectuada a vacinação é obrigatório a

formalização de um protocolo entre a DRA, o suicultor e o médico veterinário. A estratégia vacinal obedece aos seguintes critérios (Federação Portuguesa de Associação de Suicultores, 2011):

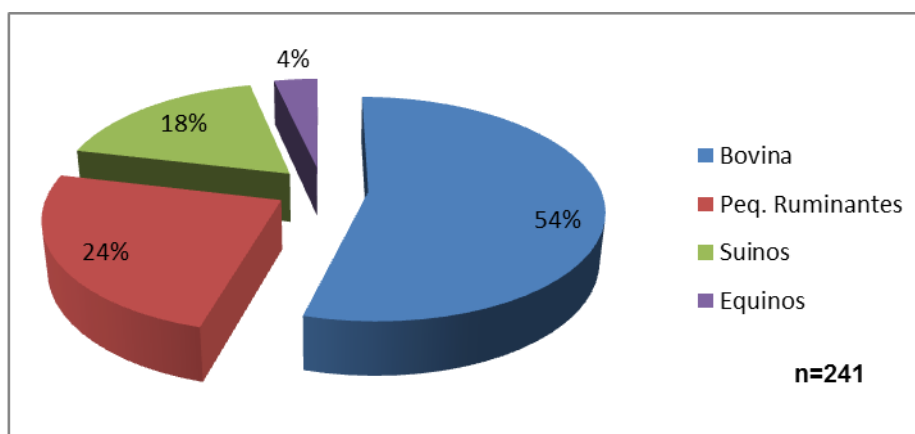
- Vacinação obrigatória nas explorações de recria e acabamento.
- Vacinação obrigatória nas explorações de suínos que não efectuaram avaliação epidemiológica;
- Vacinação obrigatória nas explorações de suínos que tendo efectuado avaliação epidemiológica apresentaram resultados serológicos positivos;
- Vacinação dos reprodutores (3 vezes por ano);
- Vacinação dos animais de engorda (pelo menos 1 vez por ano entre as 10 e 12 semanas de vida);
- Utilização exclusiva de vacinas deletadas em gE;
- Proibição de vacinação com vacinas com glicoproteína gF.

3. Descrição das actividades realizadas no âmbito da área clínica

No âmbito da área clínica, as intervenções periódicas como *follow up* de casos clínicos, vacinações, desparasitações, etc., foram intercaladas por consultas de emergência. Pelo facto de o concelho ser muito extenso e de as actividades realizadas pelo Dr. Nuno Raposo não se limitarem às fronteiras do concelho, decorreu algum tempo “morto” durante as viagens. Estas alturas eram aproveitadas para discussão e esclarecimento de dúvidas, potenciando o tempo disponível e tornando as viagens mais profícuas.

Das consultas efectuadas durante o meu estágio, a espécie bovina liderou os casos, seguida pelos pequenos ruminantes e pelos suínos. As consultas a equídeos foram esporádicas e pouco diversificadas (Gráfico 1). De salientar que a maior parte da casuística observada na espécie bovina foi em efectivos de carne.

Gráfico 1 – Casuística observada durante o estágio, por espécies.



Apesar da diversificação dos casos clínicos observados em bovinos, a patologia do aparelho digestivo foi a mais frequente. Para tal contribuíram os episódios de diarreias em vitelos que levaram à escolha do tema da presente dissertação.

Figura 1 – Pormenor da bexiga de um vitelo suspeito de Leptospirose.



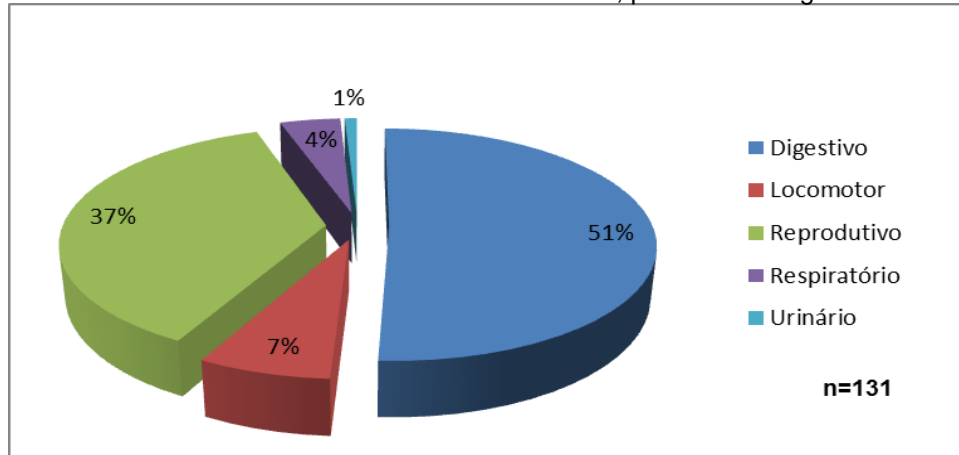
Outra vertente forte foi a clínica de Obstetrícia. O período de estágio coincidiu com a época de partos, aos quais o Dr. Nuno Raposo e o Dr. Rui Silva dão extrema importância, não fosse o vitelo, o produto de um ano de trabalho do produtor e a principal fonte do seu rendimento.

Figura 2 – Vitelo recém nascido.



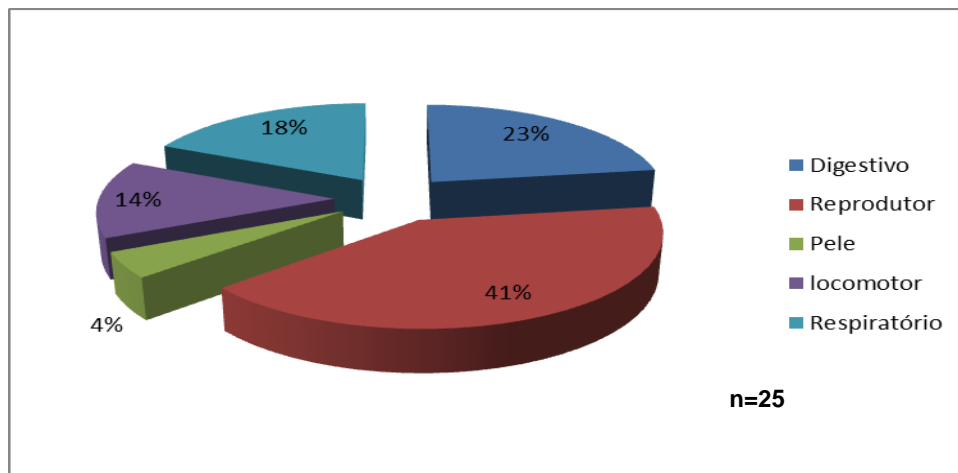
Assim sendo, muitas das consultas em que participei foram feitas a altas horas da noite e muitas vezes à chuva e ao frio. No entanto, o prazer de resolver uma distócia e de ver o primeiro contacto visual entre mãe e filho rapidamente faziam esquecer tais adversidades.

Gráfico 2 – Casos clínicos observados em bovinos, por sistema orgânico.



Também na actividade clínica de pequenos ruminantes, a maioria das intervenções foram do foro reprodutor

Gráfico 3 – Casos clínicos observados em pequenos ruminantes, por motivo de consulta.



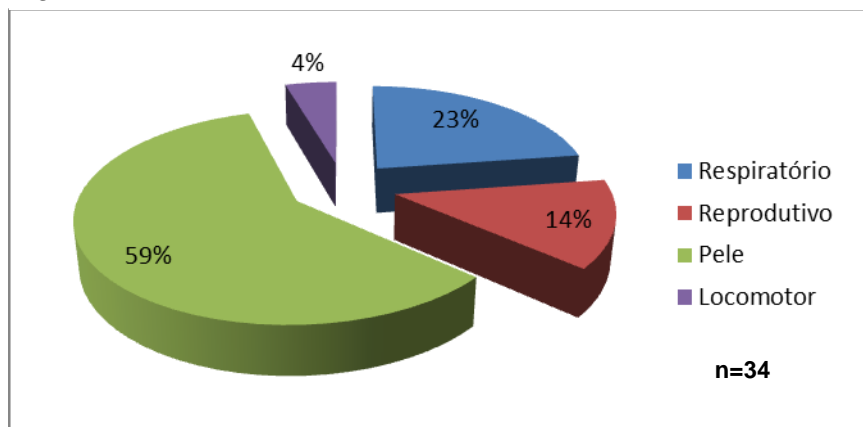
De entre as diversas consultas do foro reprodutor que assisti, a grande maioria foram partos, dos quais destaco um parto trigémeo a uma cabra.

Figura 3 – Parto de uma cabra anã.



A maioria das consultas a suínos foram realizadas em pequenas explorações familiares com um efectivo reduzido. O maior número de casos observados foi de Mal Rubro, doença infecciosa causada pelo *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Acompanhei também vários casos de Doença dos Edemas, causada pela *Escherichia coli*, de pneumonias e alguns partos.

Gráfico 4 – Casos clínicos observados em suínos, por sistema orgânico.



A clínica de equinos, que foi a que teve menos solicitações (n=7) e, para além das vacinações, circunscreveu-se a dois sistemas: o reprodutivo e o digestivo; sendo os principais motivos de consulta no aparelho reprodutivo foram as castrações e no digestivo, as cólicas.

Figura 4 – Vacinação de um pónei



Durante o estágio tive ainda a oportunidade de colaborar em algumas consultas de rotina, vacinações e ovário-histerectomias em cadelas e em gatas no consultório de animais de companhia da “Vettotal”.

II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Síndrome diarreia

A diarreia é uma manifestação clínica comum em vitelos e uma das maiores causas de perturbação do bem estar animal. Os produtores podem sofrer sérias perdas económicas devido aos custos de diagnósticos e medicamentos veterinários, mortalidade, baixas taxas de crescimento e fertilidade reduzidas (Waltner-Toews, Martin & Meek, 1986; Silverlas, de Verdier, Emanuelson, Mattsson & Bjorkman, 2010).

A síndrome diarreia tem uma etiopatogenia complexa, devido à diversidade de agentes envolvidos, quer em associação ou isolados, que podem estar envolvidos nos surtos. Por outro lado, factores ambientais, dos quais destacamos o manejo e a dieta podem influenciar a severidade e a dinâmica da doença (Garcia et al., 2000). Hoje em dia, a *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), o *Cryptosporidium parvum*, o rotavírus e o coronavírus parecem ser os principais agentes etiológicos envolvidos na diarreia de vitelos.

Segundo os mecanismos fisiopatológicos, as diarreias infecciosas em vitelos podem ser divididas em mal-absortivas, secretórias ou ambas (Foster & Smith, 2009).

2. Etiologia

2.1. *Cryptosporidium*

Em 1907 Tyzzer descreveu pela primeira vez um organismo celular associado à mucosa gástrica em murganhos, o *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1910), assim denominado devido à ausência de esporozoítos dentro dos oocistos, uma característica das outras coccídeas (Tzipori & Widmer, 2008). Anos mais tarde, o mesmo cientista descobriu um organismo idêntico no intestino delgado de ratos e, desde então, a sua identificação foi-se generalizando às demais espécies, desde mamíferos, peixes, aves e moluscos (Fayer, Morgan & Upton, 2000).

A sua filogenia ainda é muito controversa; alguns Autores colocam-no na base do filo *Apicomplexa* (Zhu, Keithly & Philippe, 2000), outros não o incluem nas coccídeas (Morrison et al., 2004) e outros tendem a aproximá-lo dos protozoários do grupo Gregarina (Carreno, Martin & Barta, 1999). Segundo Plutzer & Karanis (2009), a melhor maneira de classificar o *Cryptosporidium spp* é a seguinte: *Cryptosporidium spp* pertence ao Filo Apicomplexa cujos membros possuem um complexo apical; Classe Sporozoa, cujos membros se reproduzem

por ciclos sexuais e assexuais; Subclasse Coccidia, pois o ciclo de vida envolve merogonia, gametogonia e esporogonia; ordem Eucoccidiia, onde a esquizogonia ocorre; Subordem Eimeriina, onde a micro e macrogamia se desenvolve e Família *Cryptosporidiae*, cujos membros têm quatro esporozoitos nus dentro dos seus oocistos.

2.1.1. Epidemiologia

Os bovinos são a espécie mais estudada em relação à distribuição e prevalência da infecção por *Cryptosporidium spp.*

Existem quatro espécies de *Cryptosporidium* capazes de infectar os bovinos: *C. parvum*, cujo nome foi proposto ser substituído por *C. pestis* (Slapeta, 2006) e que é o principal agente etiológico da doença; *C. bovis*, *C. ryanae* e *C. andersoni* (Fayer, Santin, Trout & Greiner, 2006; Robinson et al., 2006; Santin, Trout & Fayer, 2008; Wyatt, Riggs & Fayer, 2010).

Um estudo efectuado nos Estados Unidos, no qual se avaliaram 7639 vitelos em 1103 explorações, revelou que 59,1% das explorações e 22,4% dos vitelos estavam infectados. Neste estudo o principal factor de risco identificado foram as maternidades múltiplas com mais de 100 vacas aleitantes (Garber, Salman, Hurd, Keefe & Schlater, 1994). Em Espanha, num estudo de 287 fezes diarreicas de vitelos foi detectado a presença de oocistos em 57,8% das fezes. Destas, 149 foram genotipadas e a única espécie encontrada foi o *Cryptosporidium parvum* (Quilez et al., 2008). No Norte de Portugal foi igualmente realizado um estudo numa amostra de 291 vitelos e 176 bovinos adultos. A infecção por *Cryptosporidium spp* foi de 25,4% nos vitelos e de 4,5% dos bovinos adultos (Mendonça et al., 2007). Em França, num estudo englobando 440 vitelos, foi calculada uma prevalência de 43.4%. A raça e o tipo de estabulação não se revelaram factores de risco na parasitose. Foram detectados picos de excreção no Inverno que os autores atribuíram ao regime reprodutivo da região (Lefay, Naciri, Poirier & Chermette, 2000).

A prevalência é alta nos vitelos com mais de uma semana de idade uma vez que o período pré-patente é de 4 a 8 dias. No entanto, estão descritos casos de vitelos com menos de uma semana que excretavam oocistos de *Cryptosporidium spp* (Garber et al., 1994; de la Fuente et al., 1999; Lefay et al., 2000; Uga et al., 2000; Fayer, 2004; Brook, Anthony Hart, French & Christley, 2009).

A infecção faz-se por via oro-fecal (Thompson, Palmer & O'Handley, 2008). Parece haver um pico de excreção por parte das vacas assintomáticas na altura do parto (Ralston, McAllister & Olson, 2003).

No Homem está demonstrado que a contaminação se dá por via oro-fecal sendo a dose infecciosa baixa o que significa que são necessários poucos oocistos para contrair infecção e exibir sintomatologia (DuPont et al., 1995).

Os oocistos mantêm-se viáveis durante bastantes meses, principalmente em ambientes frios e húmidos. Estudos em laboratório testaram a resistência dos oocistos à temperatura, radiação e dessecação. Oocistos guardados em água desionizada a temperaturas entre 0° e 20°C foram capazes de infectar ratos seis meses depois. O aumento de temperatura levou a uma diminuição progressiva da capacidade infecciosa que aos 35°C só perdurou por uma semana (Fayer, Trout & Jenkins, 1998). Outros Autores demonstraram que em água corrente a 4°C, a capacidade infecciosa do *Cryptosporidium spp* perdurou por 13 meses (Chen, Huang, Qin, Zhao & Pan, 2007). Num estudo realizado por Robertson, Campbell & Smith (1992) apenas 3% dos oocistos secos numa lâmina de microscópio à temperatura ambiente por duas horas mantiveram a capacidade infecciosa. Tempos de secagens ligeiramente superiores resultaram na morte de 100% dos oocistos. Amostras de solos colhidas em 37 explorações de bovinos leiteiros no Estado de Nova Iorque foram analisadas e revelaram uma maior quantidade de oocistos nos solos de pH 3,7-6,4 do que nos solos de pH 6,5 – 9,75 (Barwick, Mohammed, White & Bryant, 2003).

O *Cryptosporidium spp* é um parasita isolado frequentemente nos cursos de água e em água de rede. Num estudo realizado na região de Hokkaido, Japão, analisaram-se 10 rios para a presença de oocistos. Em 6 rios foram isolados oocistos de *Cryptosporidium spp* e das 28 amostras analisadas, 14 foram positivas (Tsushima et al., 2001). No Norte de Espanha foram analisadas 284 amostras de água de diferentes origens. Detectaram-se oocistos de *Cryptosporidium spp* em 63% de amostras de rio, em 33,3% de amostras de reservatórios, em 30,8% de amostras de águas de estações de tratamento e em 26,8% de amostras de água corrente de municípios (onde o tratamento é apenas realizado por cloronização) (Carmena, Aguinagalde, Zigorraga, Fernandez-Crespo & Ocio, 2007).

Em Portugal, foram investigadas 157 amostras de água, quer de superfície quer de profundidade, sendo que 47,3% dessas amostras continham oocistos de *Cryptosporidium spp* (Lobo, Xiao, Antunes & Matos, 2009).

Como a resistência do parasita aos desinfectantes comuns é elevada, novas técnicas estão a ser implementadas para a desinfecção das águas, como a desinfecção por radiação UV pulsátil e por ozono. Estas técnicas mostram-se relativamente eficazes na inactivação dos oocistos, obtendo-se uma redução de 6log₁₀ e 100% de inactivação com uma concentração de 24 mg de Ozono/L, respectivamente (Lee et al., 2008; Pereira et al., 2008).

Desde 1980 que surtos de criptosporidiose em estudantes de veterinária, técnicos e em crianças residentes em campos agrícolas são associados ao contacto com vitelos infectados (Preiser, Preiser & Madeo, 2003; Smith et al., 2004; Kiang et al., 2006). Surtos epidémicos em humanos propagados através da comida e da água foram atribuídos a adubo bovino que

se utiliza para fertilização de pastagens (Glaberman et al., 2002; Howe et al., 2002; Blackburn et al., 2006). Nos Estados Unidos da América (EUA) a incidência de criptosporidiose é maior em zonas onde as vacarias de leite são mais intensivas e no Reino Unido onde a prática de espalhar adubo é mais frequente (Lake et al., 2007; Yoder, Harral & Beach, 2010). O surto epidémico de *Cryptosporidium spp* de maior proporção ocorreu em Milwaukee (Wisconsin, EUA) em 1993. A fonte foi a água de consumo público e cerca de 403.000 pessoas foram infectadas e 100 faleceram (Mac Kenzie et al., 1994).

Os quadros clínicos da criptosporidiose humana são de uma diarreia aguda que é normalmente autolimitante. No entanto, em pessoas imunossuprimidas, a diarreia prolonga-se, podendo inclusivé afectar o sistema hepatobiliar e respiratório (Tzipori & Widmer, 2008).

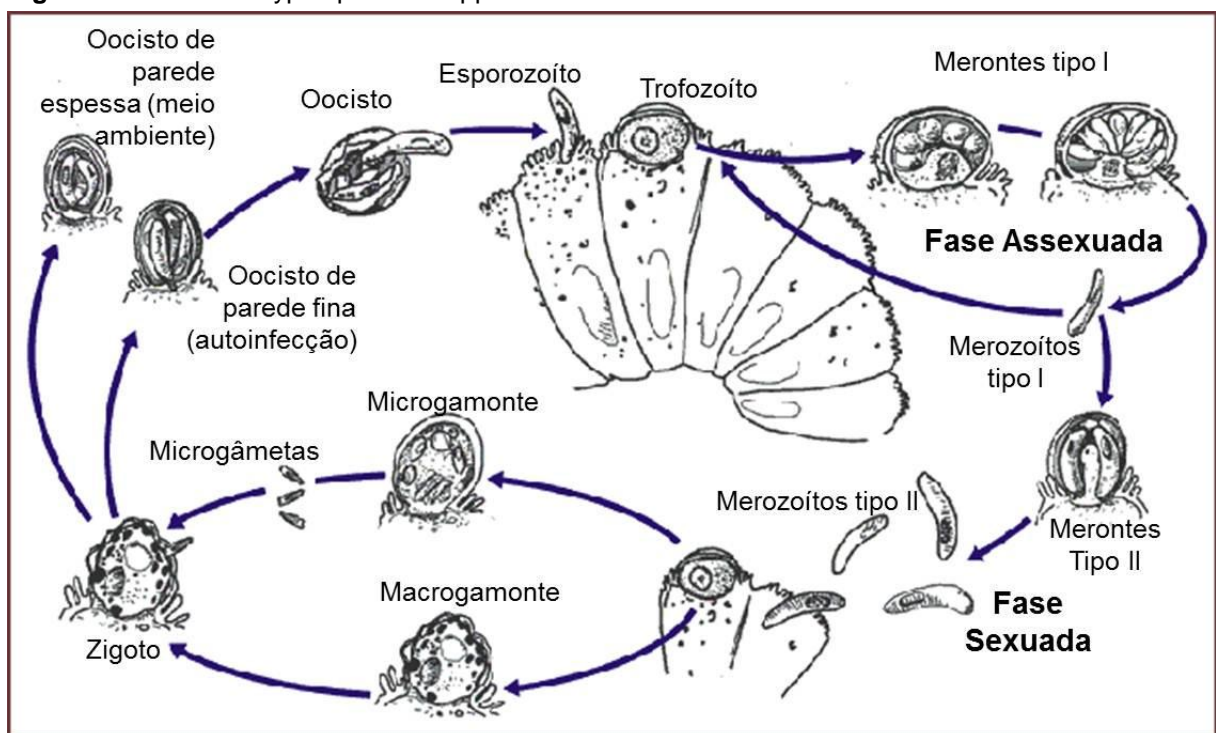
Poucas ou nenhuma drogas estão licenciadas para o combate à infecção por *Cryptosporidium spp*. Consequentemente, o tratamento é sintomático e faz-se com eritromicina, azitromicina, paromicina, nitazoxanida e loperamida mas com baixa eficácia. A falta de percepção da gravidade da doença e a inclusão de outros parasitas mais patogénicos no Filo Apicomplexa levaram a um esquecimento dos grandes grupos farmacêuticos em desenvolver drogas efectivas contra o parasita. No entanto, a inclusão da criptosporidiose na categoria B de bioameaça pelo *National Institutes of Health*, nos E.U.A. pode encorajar o interesse das farmacêuticas neste parasita, que com o sucesso das novas terapias anti-retrovirais em doentes imunodeprimidos ponderam desviar fundos para outras pesquisas (Tzipori & Widmer, 2008).

2.1.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida do *Cryptosporidium spp* encontra-se esquematizado na Figura 5. É um ciclo monoxeno, onde todas as fases, sexuada e assexuada decorrem no mesmo hospedeiro. A infecção ocorre quando os oocistos esporolados são ingeridos. Estes consistem de uma parede trilâminar que protege os 4 esporozoítos das agressões externas. Após ingestão, os oocistos são expostos ao ácido gástrico e aos sais biliares, levando ao desenquistamento de quatro esporozoítos no intestino. Os esporozoítos, móveis e com organelas secretórias apicais, invadem as células epiteliais intestinais do ileo, onde a infecção tende a instalar-se mas podem também invadir qualquer porção do tracto gastrointestinal, desde o abomaso ao cólon. Os esporozoítos criam uma invaginação da membrana luminal, permitindo uma localização extra-citoplasmática mas intracelular, conhecida como vacúolo parasitóforo. Neste vacúolo, os esporozoítos transformam-se em células arredondadas, os trofozoítos. É nesta fase que se dá a reprodução assexuada – merogonia ou esquizogonia – formando os merontes. O *C. parvum* forma dois tipos de merontes ou esquizontes. Os merozoítos de primeira geração (ou Tipo I) são libertados para o lúmen, onde formam mais merontes Tipo I

ou Tipo II. Os merontes de Tipo I contêm de 6 a 8 merozoítos. Cada merozoíto infecta novas células epiteliais, reiniciando a merogonia. Os merontes de Tipo II contêm 4 merozoítos. Apenas os merozoítos do meronte de Tipo II iniciam a fase sexuada – gametogamia – diferenciando-se em micro ou macrogamontes. O microgamonte torna-se multinucleado, sendo que cada núcleo se incorpora num microgametócito, uma célula flagelada. O macrogametócito mantém-se uninucleado, como um óvulo. O microgametócito fertiliza o macrogametócito, resultando em oocistos de parede fina ou oocistos de parede espessa. Os oocistos de parede fina são responsáveis pela auto-infecção, enquanto que os de parede espessa são responsáveis pela contaminação ambiental, uma vez que são expelidos nas fezes (Fayer, 2007; Foster & Smith, 2009).

Figura 5 – Ciclo do *Cryptosporidium* spp.



Fonte: adaptado de Medical Structural Genomics of Pathogenic Protozoa (2011)

2.1.3. Fisiopatologia

2.1.3.1. Diarreia por má absorção

Está demonstrado que a infecção por *Cryptosporidium* spp conduz a uma atrofia severa das vilosidades intestinais em variadas espécies, incluindo os vitelos (Heine, Pohlenz, Moon & Woode, 1984; Argenzio et al., 1990). Esta atrofia é causada pela perda de enterócitos e subsequente retracção das vilosidades para manter intacta a barreira epitelial. Observa-se

também uma hiperplasia das criptas numa tentativa de substituir a perda de células epiteliais, ainda que em infecções maciças possa haver quebra da barreira epitelial independentemente dos mecanismos de protecção utilizados. No entanto, continua por elucidar se esta perda de células é efeito directo do parasita ou se resulta da resposta imunitária desencadeada pelo hospedeiro para combater a infecção (Foster & Smith, 2009).

Existem dois modelos explicativos da perda de células pelo epitélio: o primeiro invoca o efeito citotóxico do parasita no tecido intestinal (Griffiths, Moore, Dooley, Keusch & Tzipori, 1994; Laurent et al., 1997). O segundo invoca mecanismos de apoptose celular (Gookin, Nordone & Argenzio, 2002). O resultado final é uma diarreia por má absorção, por perda de enterócitos e os consequentes transportadores, assim como uma redução na superfície absorptiva.

Esta má absorção leva a uma diarreia que varia de ligeira a fatal, dependendo da carga parasitária e de co-infecções com outros agentes.

2.1.3.2. Diarreia mediada por prostaglandinas

A perda de células epiteliais, a atrofia vilosa e a má absorção não justificam a quantidade de fluidos perdida em infecções por *C. parvum*, havendo estudos que demonstram uma secreção aniónica mediada por prostaglandinas - ião cloro (Cl^-) ou ião bicarbonato (HCO_3^-) - e a inibição da absorção de cloreto de sódio (NaCl) (Gookin, Nordone & Argenzio, 2002). A origem das prostaglandinas no tecido infectado continua a ser uma incógnita, embora alguns Autores as associem à proliferação de macrófagos na lâmina própria (Gookin et al., 2002). Os neutrófilos não parecem ser relevantes na produção de prostaglandinas, pois a inibição da sua proliferação nos tecidos afectados não se reflecte em diminuições significativas na produção de prostaglandinas (Zadrozny, Stauffer, Armstrong, Jones & Gookin, 2006).

De uma maneira geral, a infecção por *Cryptosporidium* leva à produção de dois tipos de prostaglandinas que no final têm o mesmo efeito mas que actuam de maneira distinta. Ambas são produzidas pelos macrófagos da lâmina própria, porém, enquanto a prostaglandina E_2 (PGE_2) tem um efeito directo sobre o epitélio, aumentando o cálcio citossólico e a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), a prostaglandina I_2 (PGI_2) contribui também para este aumento mas através dos nervos colinérgicos que inervam o epitélio. No final, o aumento do cAMP leva ao aumento da secreção de aniões Cl^- e HCO_3^- e à diminuição da absorção de NaCl (Gookin et al., 2002; Jones & Blikslager, 2002).

2.1.4. Diagnóstico

No início dos anos 80 do século XX a criptosporidiose humana era diagnosticada histologicamente pela observação de organismos pequenos e esféricos que correspondiam aos estágios de desenvolvimento do *Cryptosporidium* encontrados nas microvilosidades da mucosa intestinal, obtidos por biópsia ou de autópsia. Esses tecidos eram corados com hematoxilina eosina e o parasita surgia como um corpo basófilo pequeno e esférico (2 a 5µm dependendo do estágio do ciclo de vida) dentro das microvilosidades da mucosa intestinal (Current & Garcia, 1991).

Hoje em dia, o diagnóstico é baseado na detecção de oocistos em amostras de fezes, conservadas ou não. A conservação pode ser feita em formalina a 10%, acetato de sódio-formalina – SAF – ou em álcool polivinílico (PVA). No entanto, determinadas técnicas de coloração de oocistos não podem ser efectuadas em amostras de fezes conservadas em PVA.

A detecção é feita ao microscópio óptico através de um esfregaço de fezes. Para aumentar a sensibilidade do esfregaço empregam-se técnicas biofísicas de concentração de oocistos, tais como: centrifugação; concentração por formol-éter; flutuação por sacarose ou sal saturado; ou técnicas imunológicas, de que a separação imunomagnética é exemplo; seguindo-se uma coloração, das quais a Auramina e o Ziehl-Nielsen modificado são as mais usadas (Smith, 2007).

Para uma detecção rápida e “no campo”, existe um teste imunocromatográfico para detecção de *Cryptosporidium parvum* em fezes de vitelos (Diagnostics, 2011).

No diagnóstico sorológico há ainda a destacar a técnica de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) que permite a detectar indivíduos portadores sãos (Current & Garcia, 1991). Esta técnica também permite a detecção de antígenos de *Cryptosporidium* nas fezes (Ungar, 1990).

2.1.5. Tratamento

Actualmente não são conhecidas drogas capazes de eliminar eficazmente o parasita. Devido à localização do *Cryptosporidium* no interior do vacúolo parasitóforo, as drogas que actuam no lúmen intestinal não afectam o parasita e as drogas que atravessam o epitélio acumulam-se na lâmina própria, não atingindo o vacúolo parasitóforo.

Recentemente, demonstrou-se que a nitazoxanida (NTZ) é eficaz contra a criptosporidiose bovina, reduzindo a excreção de oocistos e a severidade dos sinais. Porém, é uma droga que não está regulamentada para uso em bovinos (Ollivett et al., 2009).

Assim, o tratamento alicerça-se na administração de fluídos e electrólitos por via oral ou parental, consoante o grau de desidratação para repôr o equilíbrio hidro-electrolítico causado pela diarreia aguda, até que o animal recupere. Leite inteiro de vaca deve ser dado em pequenas quantidades, várias vezes ao dia, para maximizar a digestão. A terapêutica dos vitelos deve prosseguir vários dias após o término dos sintomas. Em animais valiosos, por exemplo, mérito genético, raças autóctones, etc., deve-se considerar a nutrição parental (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007a).

Estudos indicam que se for garantida uma boa higiene dos estábulos, o lactato de halofuninona pode ser usado como medida profilática, na medida em que diminui o oocistos excretados e atrasa os sinais clínicos da diarreia. Assim sendo, os vitelos com mais idade encontram-se mais capazes de resolver sozinhos a infecção (De Waele, Speybroeck, Berkvens, Mulcahy & Murphy, 2010). Os vitelos com diarreia devem ser considerados como uma iminente fonte de contágio e por isso necessariamente separados dos saudáveis. O controlo da doença é difícil e passa por manter os vitelos separados uns dos outros nas primeiras 2 semanas, em condições óptimas de higiene e alimentação (Radostits et al., 2007a). A grande “revolução” no controlo da criptosporidiose, principalmente em vitelos, encontra-se no desenvolvimento de vacinas capazes de impedir a infecção nos primeiros dias de vida. Está em fase de testagem uma vacina para administrar nas vacas gestantes, de forma a que a ingestão de colostro seja eficiente para assegurar uma boa imunização passiva dos vitelos (Burton et al., 2010).

2.2. Coronavírus

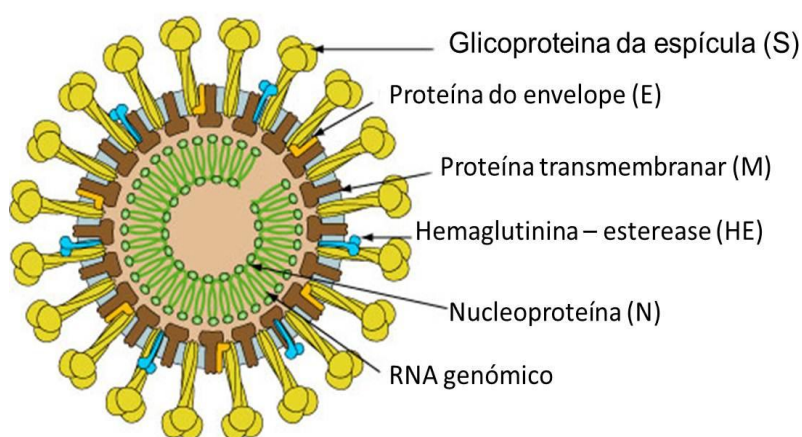
O Coronavirus bovino (BCoV) é um membro do Género *Coronavirus*, Família Coronaviridae, Ordem Nidovirales. O nome deriva do latim *corona*, que significa coroa, devido às projecções em forma de coroa que o vírus apresenta à microscopia electrónica (Index of Viruses, 2006). Este género está dividido em três grupos de acordo com os hospedeiros naturais e com as propriedades genéticas e serológicas do vírus. O Grupo 2, onde pertence o BCoV, reúne vírus que infectam os mamíferos, tais como o Vírus da Hepatite dos Ratos, o Coronavírus Entérico Humano, o Coronavírus Humano OC43 e os Coronavírus do complexo SARS (*Severe Acute Respiratory Síndrome*), entre outros (Index of Viruses – Coronaviridae, 2006).

Trata-se de um virião esférico e com envelope, contendo uma molécula de cadeia única de RNA de polaridade positiva com uma dimensão aproximada de 26 a 30 kilobases (Spagnolo & Hogue, 2000). O genoma do vírus codifica cinco proteínas principais: a proteína da

nucleocápside (N), a proteína do envelope (E), a proteína transmembranar (M) e a proteína da espícula (S) (Liu et al., 2006). Uma característica deste grupo é a presença de um gene que codifica a proteína hemaglutinina-esterase (HE), ausente nos outros grupos do género *Coronavirus* (Chouljenko, Lin, Storz, Kousoulas & Gorbalenya, 2001).

A maioria dos estudos de biologia molecular incidem sobre a espícula do vírus, pois esta tem uma importância fulcral na adesão ao ácido N-acetil-9-O-acetilneuramínico das células hospedeiras (Boileau & Kapil, 2010).

Figura 6 – Virião de Coronavírus



Fonte – adaptado de ViralZone (2010)

2.2.1. Epidemiologia

O coronavírus bovino tende a ser endémico nas populações de bovinos. Um estudo nacional feito em Inglaterra nos tanques de leite revelou uma prevalência de 100% (Paton et al., 1998). Na Suécia, a prevalência foi calculada entre 70 a 100% (Traven, Bjornerot & Larsson, 1999). Em França foi pesquisada a presença de coronavírus em fezes de vitelo. A prevalência encontrada foi baixa, 16,5%, embora a associação com episódios de diarreia fosse de 47.4% (Bendali, Bichet, Schelcher & Sanaa, 1999).

O vírus é excretado nas fezes e em descargas nasais (Reynolds, 1983) e a infecção dá-se por via oro-fecal (Kapil, Trent & Goyal, 1990). A sobrevivência fora do hospedeiro ainda não foi avaliada de forma consistente, apesar de o vírus ser considerado lábil e sensível à inactivação (Clark, 1993). Porém a evidencia científica disponível sugere que os coronavírus são mais estáveis no meio ambiente que outros vírus com envelope (Wolff, Sattar, Adegbinrin & Tetro, 2005). O pico de infecção dá-se maioritariamente no Inverno, quando a

temperatura e a radiação são baixas e a humidade alta (Kapil, Trent & Goyal, 1990; Boileau & Kapil, 2010).

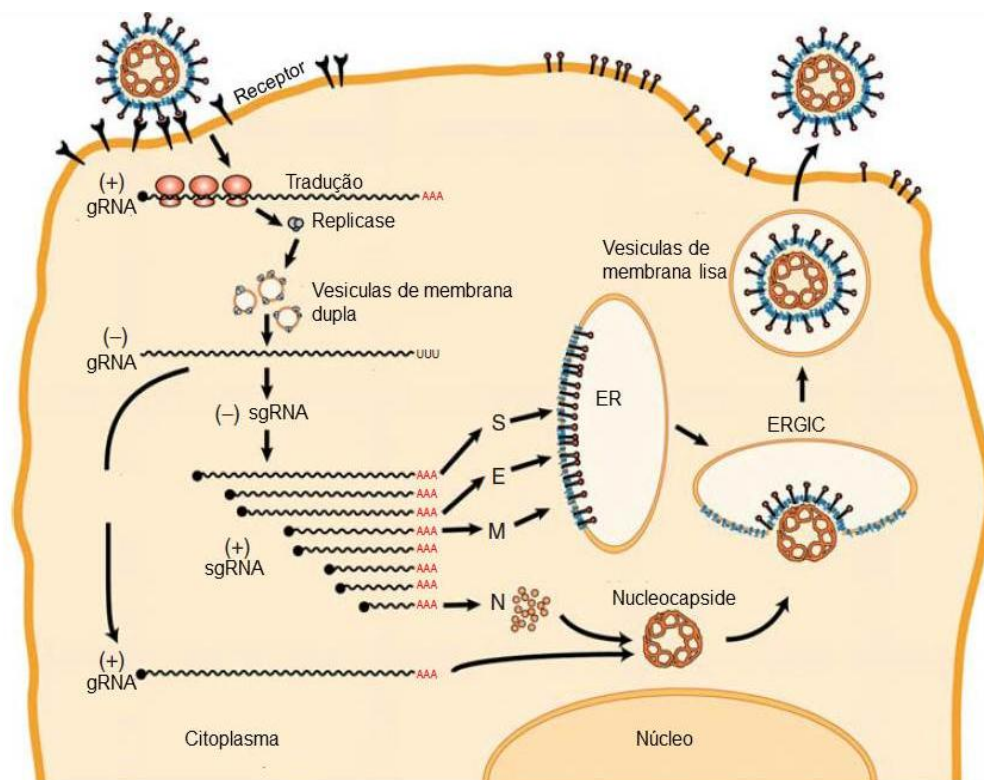
O Coronavírus bovino foi inicialmente associado na diarreia neonatal bovina (Mebus, Stair, Rhodes & Twiehaus, 1973), sendo que na década de 90 foi também implicado na Desinteria de Inverno (Saif, 1990; Alenius, Niskanen, Juntti & Larsson, 1991). Estudos experimentais sugerem que o coronavírus bovino pode causar quer a Disenteria de Inverno quer diarreia nos vitelos, o que reforça a hipótese dos adultos serem a principal fonte de infecção para os vitelos (Traven et al., 2001; Park et al., 2007). A outra é a excreção residual do Coronavírus nas fezes de vitelos e de adultos saudáveis, podendo estes ter uma importância fulcral na disseminação do vírus (Collins, Riegel, Olson & Fountain, 1987; Kapil et al., 1990; Bendali et al., 1999). Estudos de epidemiologia molecular revelaram diferenças entre os vírus de diferentes surtos epidémicos, o que indica que tem que existir nova entrada de vírus para que a doença ocorra, normalmente na sequência de compra de bovinos (Liu et al., 2006).

Actualmente é considerado um dos principais agentes de doença entérica e encontra-se também envolvido no Complexo Respiratório Bovino. Alguns Autores atribuem as diferenças sequenciais da proteína S às diferentes doenças, entérica e respiratória (Hasoksuz, Sreevatsan, Cho, Hoet & Saif, 2002) enquanto outros não evidenciam diferenças significativas em estudos filogenéticos realizados no Japão, sobre vários isolados (Kanno, Kamiyoshi, Ishihara, Hatama & Uchida, 2009).

2.2.2. Replicação

O ciclo inicia-se com a adsorção do vírus às células alvo. A adsorção é mediada pela proteína S da cápside do virião, complementada pela adesão da HE a receptores específicos. Após aderir, o virião penetra na célula ou por fusão do envelope com a membrana citoplasmática, ou por endocitose. Pensa-se que diferentes estirpes usem estratégias diferentes. No caso do BCoV a fusão do envelope acontece em pH neutro ou ligeiramente alcalino, o que sugere que a fusão se dê ao nível da membrana plasmática (Payne, Storz & Henk, 1990; Sturman, Ricard & Holmes, 1990; Lai, Perlman & Anderson, 2007). Após a descapsidação, cujos mecanismos ainda não estão totalmente elucidados, é iniciada a transcrição com a síntese de uma RNA-dependente-RNA-polimerase, uma replicase viral poliproteica, no citoplasma. Estas proteínas da replicase viral vão sequestrar membranas da célula hospedeira criando as vesículas de dupla membrana, local onde vão decorrer as etapas seguintes de replicação e transcrição (Baker, 2008).

Figura 7 – Replicação dos Coronavírus



Legenda: gRNA- RNA genômico, sgRNA – RNA subgenômico ER – Reticulo Endoplasmático

Fonte: Adaptado de Baker (2008).

O genoma viral é inicialmente transcrito numa cadeia de RNA de polaridade negativa, usando como molde a cadeia de polaridade positiva. Esta cadeia de polaridade negativa é então usada para sintetizar os diferentes RNA subgenômicos (mRNA de origem viral) e o RNA genômico de polaridade positiva. Os RNA subgenômicos são traduzidos nos ribossomas celulares, produzindo as diferentes proteínas do virião. A proteína N liga-se ao RNA genômico para formar a cápside helicoidal no citoplasma. As proteínas M, S e HE são integradas nas membranas do retículo endoplasmático (RE). A proteína E está presente em pequenas quantidades no espaço entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, o espaço ERGIC. A cápside interage com a proteína M no retículo, promovendo o brotamento do vírus para o interior deste, resultando na membrana do envelope do virião. Após brotamento, o virião continua a sofrer modificações morfológicas, desta vez no complexo de Golgi, até apresentar uma estrutura central elétron-densa, característica das partículas maduras. A extrusão é feita através de vesículas que transportam o virião até à superfície da célula (Lai et al., 2007).

2.2.3. Fisiopatologia

2.2.3.1. Diarreia Mal absorptiva

A infecção inicia-se nas porções proximais do intestino delgado, alastrando-se depois pelo jejuno, íleon e cólon. A adesão às células faz-se através da proteína S e da HE, culminando na fusão do envelope com a membrana celular. Uma vez no interior da célula, o vírus replica-se e é excretado pelos mecanismos secretórios normais e na altura da morte celular. As células epiteliais infectadas morrem, sendo substituídas por células imaturas. A esta mudança histológica acresce o encurtamento das vilosidades. Por outro lado, a extensão colónica também se apresenta alterada, exibindo atrofia das criptas (Mebus, Stair, Rhodes & Twiehaus, 1973; Mebus, Newman & Stair, 1975). A substituição epitelial e o encurtamento das pregas e das vilosidades intestinais levam a uma diarreia por má absorção. Ao acúmulo de fluídos característico deste tipo de diarreia junta-se uma hiperplasia compensatória das células das criptas que aumentam as secreções e exacerbam o volume de fluídos no lúmen intestinal (Moon, 1978). A presença de células imaturas no topo das vilosidades incapazes de secretar as enzimas necessárias à digestão e a diminuição da superfície absorptiva intestinal altera todo o mecanismo homeostático da absorção e digestão.

2.2.4. Diagnóstico

A infecção por coronavírus pode ser confirmada laboratorialmente quer directamente, por detecção de vírus ou ácidos nucleicos virais em amostras de fezes ou em zaragatoas nasais, quer indirectamente por detecção de anticorpos no leite ou no soro sanguíneo.

A detecção das partículas virais por coloração negativa ao microscópio electrónico tem as suas desvantagens. Além de nem todos os laboratórios disporem de um microscópio electrónico, é complicado proceder a um diagnóstico correcto nos casos em que o vírus apresenta uma forma ou tamanho pouco característicos ou quando a amostra está contaminada com partículas semelhantes a vírus, tais como membranas, ribossomas, organelos celulares e bacteriófagos (Athanassious et al., 1994).

As técnicas de PCR, tais como RT-PCR ou nested PCR são métodos bastante sensíveis de detecção de mRNA de BoCV (Cho et al., 2001).

As técnicas de ELISA para detecção de antigénio nas fezes demonstraram ser bastante sensíveis em comparação com as técnicas de microscopia e hemaglutinação (Schoenthaler & Kapil, 1999).

Já foram desenvolvidos anticorpos monoclonais para detectar a nucleocápside por imunohistoquímica (Daginakatte, Chard-Bergstrom, Andrews & Kapil, 1999).

Existem no mercado testes de imunocromatografia lateral para um diagnóstico rápido e no local de partículas de coronavírus em fezes de vitelos (Diagnostics, 2011).

A detecção de anticorpos IgA e IgM específicos do coronavírus por ELISA indirecta é mundialmente utilizada e bastante útil em testes epidemiológicos, tanto para estudos de prevalência como para monitorizar efectivos (Paton et al., 1998). O ELISA de captura de isótipos, que distingue IgA's de IgM's, pode servir também para distinguir a primo-infecção das reinfecções através da duração e da quantidade de produção de IgA (Naslund, Traven, Larsson, Silvan & Linde, 2000).

2.2.5. Tratamento

Não existe tratamento específico contra o Coronavírus. Por isso o grau de desidratação deve ser avaliado e a rehidratação, oral ou parental, deve ser efectuada. Em humanos, a fluidoterapia recomendada para crianças com diarreia aguda é de baixa osmolaridade contendo sódio e glucose. Segundo Foster & Smith (2009) esta abordagem terapêutica também deve ser seguida nos vitelos.

Deve ser garantido que os vitelos tomem colostro e que este seja contenha altos níveis de imunoglobulinas. Isto é conseguido com a vacinação das mães no último trimestre da gestação (Crouch, Oliver & Francis, 2001). A eficácia da vacinação oral de vitelos é reduzida devido aos anticorpos presentes no colostro, pelo que só deve ser adoptada em efectivos com baixos títulos de anticorpos contra coronavirus (Chase, Hurley & Reber, 2008).

Como em qualquer doença infecciosa, todos os animais doentes devem ser isolados de forma a minimizar o risco de contaminação do meio ambiente e disseminação do vírus.

2.3. Rotavírus

O rotavírus bovino foi pela primeira vez isolado em 1969. Na altura, por falta de caracterização, foi designado de Virus da Diarreia Neonatal dos Vitelos (Mebus, Underdahl, Rhodes & Twiehaus, 1969). Só em 1973 é que os rotavírus foram identificados e caracterizados. O seu nome deriva do latim *rota*, que significa roda, devido ao aspecto do vírus à microscopia electrónica (Bishop, Davidson, Holmes & Ruck, 1973). Desde então tem sido reportado como um dos principais agentes etiológicos associados a focos de diarreia neonatal bovina.

O Rotavirus é um vírus icosaédrico da Família Reoviridae. Tem um genoma composto por 11 segmentos de hélice dupla de RNA, cada um codificando proteínas estruturais ou não-estruturais (Parashar, Bresee, Gentsch & Glass, 1998). O genoma inteiro codifica seis

proteínas estruturais (VP), VP1-4, 6 e 7 e seis não estruturais (NSP), NSP1-6 (Estes, 2007; Kirkwood, 2010).

O virião é composto por (Figura 8):

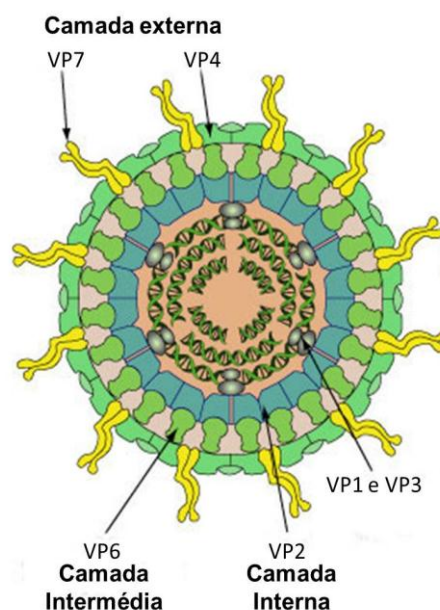
- a. o *core*, que contém o genoma viral e a VP1 e VP3;
- b. uma camada interna de proteínas – VP2;
- c. uma camada intermediária de proteínas – VP6;
- d. uma camada externa de proteínas e glicoproteínas – VP4 e VP7.

A VP4 e a VP7 são as principais proteínas responsáveis pela produção de anticorpos. A VP6 é o principal componente estrutural do virião e devido à sua enorme estabilidade e à presença de epitopos conservados entre diferentes estirpes de rotavírus, fazem dela o principal antígeno alvo dos testes de diagnóstico (Estes & Cohen, 1989; Estes, 2007).

A classificação dos rotavírus é feita seguindo um esquema de múltiplos grupos, os serogrupos, cada um contendo diversos serotipos. Um serogrupo inclui os vírus que partilham antígenos de reacção cruzada detectáveis por testes serológicos, tais como ELISA. Os rotavírus agrupam-se em sete serogrupos, de A a G. Cada serotipo, definido por provas de neutralização por redução em placa, é classificado por um sistema binomial em que os serotipos G correspondem à reactividade da VP7, uma vez que esta é uma glicoproteína e os serotipos P à reactividade da VP4, uma protease-sensível. No entanto, a dificuldade em distinguir os diferentes serotipos VP4 por esta técnica levou a adopção da classificação genotípica. Esta classificação é também binomial mas tem em conta a sequência genética da VP4 e VP7. Os genótipos e serotipos da VP7 são coincidentes, o que não acontece com os genótipos e serotipos da VP4. (Santos & Hoshino, 2005; Estes, 2007; Kirkwood, 2010).

O rotavírus bovino pertence ao grupo A, tal como a maior parte dos vírus que afectam o Homem (Parashar et al., 1998; Matthijnssens et al., 2008).

Figura 8 – Virião de Rotavírus



Fonte: adaptado de ViralZone (2011)

2.3.1. Epidemiologia

Os rotavírus são uma das maiores causas de diarreia em vitelos em todo o mundo. Em 1989 foi calculado uma prevalência de 16,4% em 450 amostras de fezes de vitelos nos arredores de Ohio, EUA (Lucchelli, Lance, Bartlett, Miller & Saif, 1992). No Brasil, em 2000 foi

calculada uma prevalência média de 63,8% em 69 fezes diarreicas, também em vitelos (Buzinaro et al., 2003). Num efectivo inglês foi feito um estudo em que a prevalência atingiu 79%, numa amostra de 57 fezes analisadas ao microscópio electrónico (McNulty & Logan, 1983). Na Turquia foram analisados soros e fezes de uma amostra de vitelos. Ainda que a prevalência nas fezes fosse apenas de 8,5%, a análise do soro revelou a presença de anticorpos para o rotavírus em 84,9% (Aycan, 2010).

Os serotipos G1, G6, G8 e G10 estavam descritos como pertencentes aos rotavírus bovinos (Lucchelli et al., 1994) mas com a caracterização de rotavírus de diversos locais e animais, esta especificidade foi-se tornando menos específica (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007b).

O vírus sobrevive bem num estado de aerossol em humidades relativas médias (45 – 55%) e a temperaturas e humidades relativas baixas. O ar pode ser um meio de disseminação e pode explicar a dificuldade em controlar os surtos e em manter as explorações livres de rotavírus (Ijaz, Sattar, Johnson-Lussenburg & Springthorpe, 1985; Ijaz et al., 1994).

A dose infectante do vírus é baixa, como prova um estudo feito em suínos por Payment & Morin (1990). Nesse estudo, apenas 90 partículas virais de rotavírus porcino bastaram para serem observados sinais clínicos nos animais inoculados. Para os humanos, as doses são também baixas, até mesmo para indivíduos adultos (Ward et al., 1986).

A infecção dos vitelos dá-se à nascença, por via oro-fecal, devido à excreção nas fezes das mães ou por contágio com outros vitelos com diarreia (Radostits et al., 2007b).

O pico de diarreia ocorre em vitelos com 1 a 3 semanas de idade (Kim, Nielsen, Hodgins, Chang & Saif, 2002). A maior parte das infecções por rotavírus são assintomáticas, presumivelmente devido aos níveis de anticorpos veiculados pelo colostro. No entanto, o sobrepovoamento que aumenta a exposição ao vírus, os suplementos dados aos vitelos que diluem o leite e o desmame precoce são factores que aumentam o risco de infecção grave (Saif & Fernandez, 1996).

Observou-se ainda que tanto cães como gatos infectados experimentalmente são capazes de excretar o vírus bovino sem manifestarem sintomas. Neste cenário, eles podem ser vectores mecânicos para os vitelos (Schwers, Hoyois, Chappuis, Dagenais & Pastoret, 1982).

O quadro clínico agrava-se quando estão presentes infecções mistas (Pearson & Logan, 1983).

Os animais que recuperam naturalmente da infecção apresentam um título de anticorpos P específicos altos enquanto a vacinação provoca um aumento nos anticorpos G específicos.

Aliado a esta particularidade, a diversidade de genótipos P e G dificultam a produção de vacinas eficazes contra o vírus (Radostits et al., 2007b).

O papel do rotavírus como agente zoonótico ainda está por elucidar mas à luz do conhecimento actual, existem indícios que possa ser uma causa minoritária de diarreia em humanos, especialmente em crianças (Zhang, Herbst, Kousoulas & Storz, 1994; van der Heide et al., 2005; Han, Cheon, Zhang & Saif, 2006).

2.3.2. Replicação

A primeira fase do ciclo replicativo é a adsorção da partícula de três camadas à célula. Esta adsorção é mediada pela VP4, presente na camada exterior. A penetração é um processo de multi-etapas, mediado pela VP4 e pela VP7 e pensa-se que se processa através de endocitose mediada por receptores, nomeadamente pelos receptores caveola e raft dependentes (Sanchez-San Martin, Lopez, Arias & Lopez, 2004). O mecanismo que leva à descapsidação e libertação no citoplasma também não se encontra elucidado. No entanto, julga-se que envolva uma diminuição da concentração de cálcio na vesícula endossomal, que por sua vez conduz à descapsidação progressiva e esta a um aumento de permeabilidade da vesícula (Martin, Lorrot, El Azher & Vasseur, 2002). Benureau, Huet, Charpilienne, Poncet & Cohen (2005) propuseram que a permeabilidade da membrana era mediada pela tripsina e esta activada pela queda da concentração de cálcio na vesícula. A tripsina activada iria clivar a VP4 e VP7 em fragmentos capazes de permeabilizar a membrana. Após remoção da camada exterior com a descapsidação, a agora partícula de dupla camada inicia a transcrição do genoma através da formação de mRNA de polaridade positiva por uma RNA-dependente-RNA-polimerase. Após formação, as novas moléculas de mRNA saem da partícula de dupla camada, que se mantém intacta, para o citoplasma e ou são transcritas e os produtos da transcrição acumulados no citoplasma ou sofrem replicação nos corpos de inclusão citoplasmáticos, os viroplasmas. É no viroplasma que se efectua a montagem do vírus. As partículas de dupla camada são formadas pelas VP1, VP2, VP3 e pela VP6 e por um de cada onze mRNA's transcritos. As partículas ligam-se através da VP6 à NSP4 que se encontra na membrana do reticulo endoplasmático rugoso e brotam deste, adquirindo temporariamente um envelope derivado da membrana do retículo. As restantes proteínas são montadas e com a maturação da partícula, o envelope é reduzido a uma fina camada de proteínas que no virião maduro corresponde à camada exterior (Desselberger et al., 2009). A formação do RNA de dupla camada não é totalmente compreendida. Especula-se que os mRNA's positivos que servem de molde para produzir a cadeia negativa provêm da transcrição ocorrida na partícula de dupla camada após descapsidação mas estudos recentes mostraram que tal poderá não ser verdadeiro e as cadeias positivas serem

produzidas dentro do viroplasma por um mecanismo ainda desconhecido (Santin et al., 2004). Após a maturação, a célula lisa e o virião é liberto.

2.3.3. Fisiopatologia

2.3.3.1. Diarreia mal absorvível

O processo que desencadeia a diarreia inicia-se quando o vírus se liga à célula através de receptores específicos e a invade recorrendo a mecanismos ainda desconhecidos. O vírus replica-se na célula, levando à morte do enterócito. A má absorção é devida à perda de superfície intestinal, e os nutrientes não absorvidos criam um gradiente osmótico, havendo movimento de fluidos para o lúmen intestinal. Por outro lado, a secreção de fluídos pelas criptas aumenta a quantidade de fluído no lúmen, contribuindo para a diarreia (Ramig, 2004).

No entanto, como a severidade dos sinais clínicos não eram acompanhados por danos histológico equivalentes nos tecidos, suspeitou-se de outro mecanismo. A incógnita manteve-se até que Ball, Tian, Zeng, Morris & Estes (1996) descobriram que a NSP4 tinha uma acção enterotóxica. Esta enterotoxina viral tem a capacidade de induzir uma diarreia dependente da dose e idade, clinicamente similar à produzida pelos rotavírus. A proteína é sintetizada durante a replicação viral no interior da célula e o seu efeito é produzido na própria célula. Quando a célula morre, a proteína é libertada e actua de forma parácrina (Zhang, Zeng, Morris & Estes, 2000). A exposição exógena das células epiteliais intestinais à NSP4 permite que esta se ligue à caveolina-1, presente em invaginações especiais da membranas citoplasmática e do RER, as cavéolas. Esta ligação faz aumentar o cálcio citoplasmático tanto por libertação dos depósitos de cálcio do retículo endoplasmático rugoso como por aumento do movimento deste através da membrana plasmática (Tian et al., 1995). Este processo é mediado pela fosfolipase C aumentando a quantidade de inositol trifosfato (Dong, Zeng, Ball, Estes & Morris, 1997). O aumento de cálcio intracelular tem como consequência a inibição da translocação de dissacarídeos das vesículas intracelulares para o lúmen intestinal, havendo um défice digestivo de carboidratos que agravam a diarreia (Brunet et al., 2000). Por último, a NSP4 inibe o principal co-transportador sódio-glucose, o SGLT1, que é peça chave na absorção de água (Halaihel, Lievin, Alvarado & Vasseur, 2000; Zadrozny et al., 2006).

2.3.3.2. Diarreia secretória

O componente secretório da diarreia provocada pelo rotavírus parece ser secundário a alterações funcionais produzidas pelo vírus nas microvilosidades do epitélio. Julga-se que os principais intervenientes na secreção são a NSP4 e o sistema nervoso entérico. Os mecanismos exactos da fisiopatologia associada à NSP4 continuam, no entanto, desconhecidos. Ela pode simplesmente ampliar os efeitos da infecção (Ramig, 2004) ou, actuar no epitélio das criptas onde promove um aumento da concentração de cálcio, activa a secreção de cloro e levar a uma saída de água. Sabe-se que a secreção de cloro não está relacionada com o canal de cloro dependente do cAMP (Angel, Tang, Feng, Greenberg & Bass, 1998) mas a sua origem ainda não foi explicada. Pensa-se que a NSP4 possa formar um canal ou que active um canal de anião activado por ião cálcio (Ca_2^+) dormente (Morris et al., 1999).

A forma como o sistema nervoso entérico é estimulado também ainda não é clara. Sabe-se que existem outras toxinas capazes de estimular este sistema, levando a que as células enterocromafins libertem 5-hidroxitriptamina (5-HT), uma molécula estimuladora do sistema nervoso entérico. É possível que tal como estas toxinas, a NSP4 se ligue às mesmas células, provocando a libertação da 5-HT (Lundgren & Svensson, 2001). Da mesma forma, a libertação de prostaglandinas e quimocinas pelo enterócito infectado poderá ter um papel importante na estimulação do sistema nervoso.

2.3.4. Diagnóstico

O diagnóstico é feito quando se demonstra, directa ou indirectamente, a presença do vírus na amostra biológica.

A detecção do vírus pode ser feita por microscopia electrónica com as mesmas desvantagens referidas para os Coronavírus (Athanassious et al., 1994). Testes como a precipitação em ágar gel, a electroforese em gel de poliacrilamida desnaturada pelo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e corada pela prata, ELISA e imunofluorescência directa e indirecta, assim como o PCR, nomeadamente o RT-PCR, são capazes de detectar partículas de rotavirus (Khattar & Pandey, 1990; Al-Yousif, Al-Majhdi, Chard-Bergstrom, Anderson & Kapil, 2000; Stockman et al., 2008).

Existem no mercado testes de imunocromatografia lateral para um diagnóstico rápido e no local de partículas de rotavírus em fezes de vitelos (Diagnostics, 2011).

2.3.5. Tratamento

Os mesmo princípios recomendados para os coronavírus são aplicam-se aos Rotavírus. Uma boa determinação do grau de desidratação com a consequente fluidoterapia é a única intervenção que pode ser feita quando o animal apresenta diarreia. Embora fosse previsível que a fluidoterapia não seja eficiente devido à acção da NSP4, ainda não foi provado clinicamente nem experimentalmente que tal ocorra (Foster & Smith, 2009).

Tal como nos coronavírus, a prevenção faz-se através da vacinação da mãe no último trimestre de gestação para garantir uma concentração de anticorpos no colostro que garantam uma protecção eficaz do vitelo. A eficácia da vacinação oral de vitelos é reduzida devido aos anticorpos presentes no colostro, pelo que só deve ser adoptada em efectivos com baixos títulos de anticorpos contra rotavírus (Chase et al., 2008). A separação dos animais doentes dos sãos volta a ser fundamental.

2.4. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é a espécie tipo do Género *Escherichia* que reúne maior parte dos bacilos Gram-negativos móveis da família *Enterobacteriaceae*. É uma bactéria anaeróbia facultativa e não-esporulada, comensal dos intestinos dos mamíferos desde os primeiros dias de vida. Apresenta uma forma bacilar de aproximadamente 2 µm (Nataro & Kaper, 1998). A parede celular consiste de uma membrana externa e uma interna separadas por peptidoglicanos. Estão presentes diversas proteínas em cada membrana, algumas atravessando-as inclusive. A cápsula (antigénio K) é o componente estrutural exterior da parede celular bacteriana e é composta por carboidratos. Os antigénios somáticos (antigénios O) são compostos por determinantes antigénicos formados pelos diferentes tipos de açúcares e as ligações entre eles, localizado na porção “O” do lipopolisacarídeo. O flagelo, organela usada pela *E. coli* para locomoção, é constituído por subunidades proteicas, as flagelinas. O antigénio flagelar (H) tem por base os diferentes tipos de flagelinas que podem constituir o flagelo (Hirsh, MacLachlan & Walker, 2004).

Os diferentes serótipos da *E. coli* são serotipados consoante o perfil antigénico apresentado pela bactéria, nomeadamente os antigénios O e H. A antiga nomenclatura que também recorria aos antigénios K perdeu importância a partir do momento em que se descobriu que estes antigénios poderiam ser diferentes estruturas moleculares, inclusive fímbrias. Como tal, foi proposto que se usasse o fenótipo K apenas para polissacarídeos ácidos, retirando os antigénios fimbriais proteicos e designando-lhes a letra F (Nataro & Kaper, 1998).

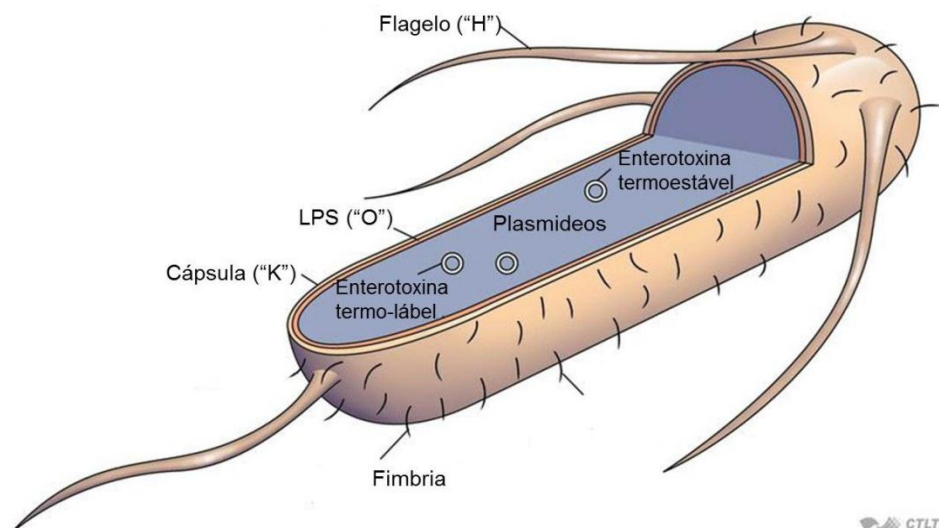
Os serótipos de *E. coli* patogénicos são conhecidos por causar três síndromes clínicas: infecção do tracto genito-urinário, sepsis/meningite e doença entérica (Nataro & Kaper, 1998).

Existem seis categorias diarreínogénicas da *E. coli* (Nweze, 2010):

- A enterotoxigénica (ETEC)
- A enteropatogénica (EPEC)
- A enterohemorrágica (EHEC)
- A enteroagregativa (EAEC)
- A enteroinvasiva (EIEC)
- A “diffusely adherent” (DAEC), cuja proposta ainda não foi plenamente aceite pela comunidade científica.

De entre estas, a enterotoxigénica é a mais comum. Factores de virulência específicos tais como enterotoxinas e factores de adesão diferenciam as ETEC das outras categorias (Figura 9). A ETEC pertence a uma família heterogénica de *E. coli* fermentadoras de lactose e com uma grande variedade de fenótipos O. Produzem enterotoxinas reguladas por plasmídeos que podem ser termo-lábeis (LT) e/ou termoestáveis (ST) e apresentam factores de adesão que permitem à bactéria colonizar o intestino (Nagy & Fekete, 1999; Qadri, Svennerholm, Faruque & Sack, 2005).

Figura 9 – Factores de virulência da *E. coli* ETEC



Fonte: Adaptado de: Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health (2011)

2.4.1. Epidemiologia

Em 1977, no Canadá, foi investigada a prevalência de ETEC em 222 vitelos de 59 explorações de bovinos de carne. Calculou-se que 18,3% (14,5% positivos apenas a *E. coli* mais 3,8% positivos a *E. coli* e a Coronavirus) dos vitelos com diarreia excretavam *E. coli* e que 48,5% dos efectivos estavam infectados (Acres, Saunders & Radostits, 1977). Um ano antes, Myers & Guinee (1976) calcularam uma prevalência de infecção por *E. coli* de 12,4% em vitelos em seis estados dos Estados Unidos da América (n=1.004 vitelos). Já em 1983, Sherwood, Snodgrass & Lawson (1983) estimaram uma prevalência de 7,2% de *E. coli* ETEC em 11,4% de rebanhos do norte da Inglaterra e da Escócia (n=1529 vitelos). Em Espanha detectaram-se 27,8% de infecções mistas por *E. coli* F5 e *Cryptosporidium* numa amostra de 218 vitelos (de la Fuente et al., 1999). Na Suíça, os resultados de Uhde et al. (2008) indicam que a prevalência se encontra nos 5,5% para a *E. coli* F5 (n=147 vitelos) e em 2,1% dos rebanhos analisados (n=71). Tais evidências sugerem que, regra geral, a prevalência de *E. coli* não é muito elevada dentro dos rebanhos.

A *E. coli* é uma bactéria pouco adaptada à infecção de vitelos maiores de idade, sendo o período óptimo de infecção entre o 1º e o 3º dia de idade (Runnels, Moon & Schneider, 1980; Sherwood et al., 1983; Holland, 1990; Wieler et al., 2007). A infecção dá-se por via oro-fecal e acontece durante o parto ou logo após este (Acres, 1985).

A sua virulência é principalmente atribuída à presença de factores de adesão (adesinas) e à produção de enterotoxinas. O F5 é o factor mais comum, embora também possam apresentar os factores de adesão F41 e 987P (Mainil et al., 1990; Shin, Chang, Timour, Lauderdale & Lein, 1994; Foster & Smith, 2009; Ok et al., 2009). Nos diversos estudos consultados a principal enterotoxina isolada em vitelos com diarreia é a enterotoxina termoestável (STa) (Gaastra & de Graaf, 1982; Shin et al., 1994). Existe outro tipo de enterotoxina termolável – STb – mas esta não parece ser uma causa importante de diarreia em vitelos, sendo detectada principalmente em leitões com diarreia (Al-Majali et al., 2000). A toxina termolável é produzida principalmente por estirpes isoladas de humanos e suínos (Acres, 1985; Nagy & Fekete, 1999).

A mortalidade depende muito das características das explorações. Em explorações bem organizadas e com excelente biossegurança, a taxa de mortalidade não vai além dos 3% mas pode chegar aos 60% em más explorações (Radostits, Gay, Hinchcliff & Constable, 2007c).

2.4.2. Fisiopatologia

2.4.2.1. Colonização

A patogenicidade da *E.coli* enterotoxinogénica inicia-se com a adesão desta às microvilosidades dos enterócitos do intestino delgado. O organismo tem defesas contra o sobrecrecimento bacteriano, nomeadamente por excreção através da peristalse desse excesso (Acres, 1985). No entanto, no caso das ETEC, a adesão resulta numa ligação forte mas morfológicamente não destrutiva da bactéria à célula do hospedeiro. É feita através de factores de adesão que podem ser fimbriais ou fibrilhares (Qadri et al., 2005). A adesão é necessária para que a bactéria não seja eliminada com a ingesta e para que as enterotoxinas por ela produzidas exerçam o seu efeito junto à mucosa, não se perdendo no lúmen intestinal. Após aderir, a *E. coli* multiplica-se à superfície das microvilosidades, formando microcolónias que podem ter várias camadas de espessura (Acres, 1985).

2.4.2.2. Diarreia secretória mediada pela toxina termo-estável

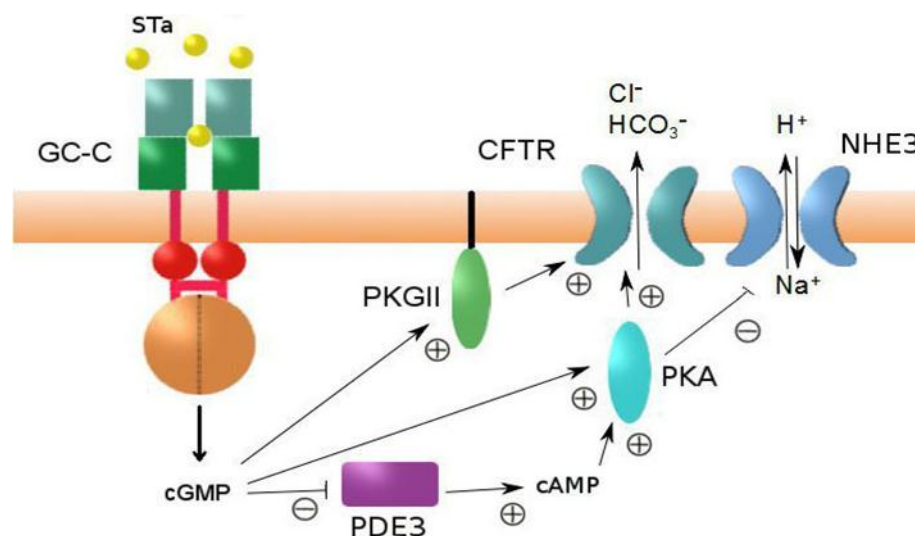
A Toxina termo-estável é um péptido de 18 ou 19 aminoácidos que é secretada por várias estirpes de ETEC (Giannella & Mann, 2003). Após a sua secreção, a toxina liga-se à guanilil cyclase-C (GCC), uma enzima presente nas microvilosidades dos enterócitos, e cuja distribuição se localiza principalmente no íleon, ao contrário dos humanos que apresentam uma concentração decrescente do início do intestino delgado ao cólon (Smith, 1965; Krause et al., 1994). Ainda não existem estudos conclusivos em vitelos, no entanto noutros mamíferos (coelhos e ratos) já foi demonstrado que a afinidade dos receptores à STa e a sua concentração diminuem com a idade das crias (Al-Majali et al., 1999; al-Majali et al., 1999; Bhattacharya & Chakrabarti, 1999), o que explicaria uma maior susceptibilidade dos neonatos à acção da enterotoxina. No entanto, em suínos com 7 semanas de idade não existe uma diminuição significativa de receptores para a STa e a actividade da GCC é maior do que nas idades mais precoces, o que sugere que a susceptibilidade dos neonatos não esteja relacionada com a quantidade de receptores à superfície, nem com uma diminuição do sinal entre o receptor da STa e a GCC (Jaso-Friedmann, Dreyfus, Whipp & Robertson, 1992).

A ligação da STa à GCC promove um aumento intracelular da guanosina monofosfato cíclica (GMPc), actuando como segundo mensageiro para activar uma quinase dependente de GMPc (GKIIC). Depois de activa, a GKIIC fosforila o regulador transmembranal da fibrose quística (CFRT), movendo-se este para a superfície apical da célula, onde activo, promove a saída de cloro para o lúmen intestinal (Golin-Bisello, Bradbury & Ameen, 2005). A GMPc

também inibe a fosfodiesterase 3, aumentando a concentração de AMPc (a fosfodiesterase 3 é responsável pela fosforilação do AMPc). Este aumento de AMPc é responsável pela activação da Proteína Cinase A que por sua vez proporciona um caminho de activação do CFRT independente da GKIIc (Weiglmeier, Rösch & Berkner, 2010). Este aumento da secreção de cloro cria um gradiente osmótico que retira água às células e que ultrapassa o limiar de absorção das vilosidades.

Existem ainda estudos que demonstraram que a STa se consegue ligar a um receptor diferente daquele, promovendo uma saída de bicarbonato que não é regulada pelo CFRT. O receptor seria a tirosina quinase e o bicarbonato actuaría, tal como o cloro, de forma a aumentar o gradiente osmótico (Sellers et al., 2005).

Figura 10 – Esquema exemplificativo da patogénese da *E. coli* ETEC



Legenda: STa – Toxina termoestável; GCC – Guanilil ciclase C; PKGII – quinase dependente de GMPc; CFTR – Regulador Transmembranar da Fibrose Quística; PKA – Proteína Cinase A; NHE3 – Transportador Sódio Hidrogénio; PDE3 – Fosfodiesterase 3; cGMP – Guanosina Monofosfato Cíclica; cAMP – Adenosina Monofosfato Cíclica; (+) – activa; (-) – inibe

Fonte: adaptado de Weiglmeier et al. (2010)

Na diarreia induzida pela STa, o componente nervoso também está envolvido, como é demonstrado pela redução da secreção produzida após administração de drogas que alteram a actividade nervosa (Eklund, Jodal & Lundgren, 1985). Mas ao contrario de outras toxinas, como a toxina da cólera, a STa parece não estar associada a uma produção de prostaglandinas ou de 5-HT mas sim ao monóxido de azoto (ON) e ao péptido vasoactivo intestinal (VIP) (Rolfe & Levin, 1994; Rolfe & Levin, 1999; Mourad & Nassar, 2000). O mecanismo exacto como as células activam os terminais nervosos ainda está por elucidar mas pode envolver a libertação de substâncias activadoras pelos enterócitos ou outras células do epitélio intestinal (Rolfe & Levin, 1999). A STa leva à activação dos neurónios

mioentéricos que enervam o plexo submucoso de onde partem os neurónios secretomotores (Rolfe & Levin, 1994). O VIP actua no enterócito aumentando a secreção do ião cloro e promovendo o aumento da pressão osmótica (Jones & Blikslager, 2002). A componente neuronal não se restringe à amplificação da secreção de cloro. Foi demonstrado que provocando uma infecção localizada no íleon, se produzia uma secreção no jejuno, secreção essa que era suspensa quando se desenergava a porção do íleon infectada (Rolfe & Levin, 1999).

2.4.2.3. Diarreia por má absorção mediada pela toxina termoestável

Em oposição aos modelos secretórios, consultámos um estudo em que se propõem que o modelo mal absorptivo é o mais adequado. Segundo este modelo, a enterotoxina bloquearia o trocador de sódio-hidrogénio. Isto levaria a uma diminuição da absorção de sódio que por sua vez aumentaria o gradiente osmótico (Lucas, 2001). No entanto, para Foster & Smith (2009) o facto de este modelo se basear apenas nas células do duodeno (a maior concentração dos receptores para a STa nos vitelos é no íleon) e de ter sido realizado em roedores não permite uma transposição dos resultados para a raça bovina.

Weiglmeier et al.(2010) explicam a má absorção provocada pela STa através da inibição do transportador sódio-hidrogénio 3 (NHE3) promovido pela activação da Proteína Cinase A. Ainda que este transportador só tenha sido procurado em intestinos de ratos e de coelhos, nestes a sua distribuição é ao longo de todo o intestino (Peijian & Yun, 2010) sendo, portanto, mais aceitável que o estudo anteriormente referido.

2.4.3. Diagnóstico

A *E. coli* é facilmente isolada de amostras biológicas em meios de cultura gerais ou selectivos incubados a 37°C em aeróbiose. Os meios mais usados são o meio de MacConkey e o de Agar de Eosina Azul de Metileno, que seleccionam os membros da família *Enterobacteriaceae* e permitem a diferenciação de organismos entéricos com base na sua morfologia (Nataro & Kaper, 1998).

A identificação das estirpes diarreiogénicas de *E. coli* requer a diferenciação destas com os organismos não-patogénicos da microflora. A serotipificação correlaciona, por vezes com alguma precisão, os serotipos com as doenças. No entanto, a serotipificação raramente é suficiente para se obter uma distinção fidedigna (Nataro & Kaper, 1998). Por isso, o diagnóstico definitivo das infecções por ETEC requer a detecção dos factores de virulência (adesinas e enterotóxicas) através de análises genotípicas e fenotípicas. As análises fenotípicas são realizadas para detecção das fimbrias patogénicas (F5) através de técnicas de imunofluorescência indirecta ou ELISA (Francis, 2002). Para as análises genotípicas são

procurados os genes codificadores das fimbrias (F5) e das enterotoxinas (principalmente a STa) por PCR e por sondas de DNA. (Franck, Bosworth & Moon, 1998; Nataro & Kaper, 1998; Francis, 2002). Para o diagnóstico laboratorial no campo, foi desenvolvido um teste imunocromatográfico que detecta a proteína F5 da *E. coli* (Diagnostics, 2011)

2.4.4. Tratamento

As soluções electrolíticas orais continuam a ser a principal forma de combater a diarreia. No caso da ETEC, dois pressupostos não podem ser negligenciados: o primeiro é que se deve maximizar a absorção de sódio por meios diferentes daqueles usados pelo tradicional trocador sódio-hidrogénio, uma vez que este pode estar inactivado. A maioria das soluções orais tira proveito do co-transportador sódio-glucose, fazendo o *bypass* do transportador sódio-hidrogénio. Não sendo uma medida curativa, pois não diminui a secreção, numa primeira abordagem vai aumentar o estado hídrico do vitelo (Argenzio, 1985); o segundo é que um aumento do pH no abomaso e no intestino proximal vai facilitar a proliferação do organismo. Uma vez que a secreção de bicarbonato parece ter importância na fisiopatologia, o seu uso deverá ser evitado. Por outro lado, o uso de acetato deve ser ponderado já que em relação ao bicarbonato não alcaliniza o abomaso (o pH baixo do abomaso é uma estratégia defensiva do órgão), fornece energia após metabolização, promove a entrada de água e sódio no intestino delgado e não interfere com a digestão do leite (Smith, 2009).

A fluidoterapia endovenosa deve ser instituída sempre que a desidratação ultrapasse os 8%, e sempre complementada com fluidoterapia oral. É sugerido que se recorra a soluções isotónicas contendo bicarbonato de sódio (Berchtold, 2009).

Medidas preventivas podem ser tomadas para reduzir a incidência de doença. As progenitoras devem ser vacinadas para o antigénio F5 no último terço da gestação para que a concentração de anticorpos no colostro seja elevada (Yano, Garcia, Leite, Pestana-de-Castro & Shenk, 1995; Crouch et al., 2001). A redução do contacto com a bactéria deve também ser promovida. Se possível, o vitelo deve nascer num ambiente de carga microbiana reduzida, seja em prados ou em boxes limpas. Deve-se garantir que ingirem colostro tão cedo quanto possível. Por último, os vitelos infectados devem sempre ser separados dos saudáveis (Radostits et al., 2007c).

III - Tema: INVESTIGAÇÃO NOSOLÓGICA DE DIARREIAS NEONATAIS INDIFERENCIADAS EM VITELOS NO CONCELHO DE ODEMIRA

1. Objectivos

Este estudo teve como objectivo investigar a presença de *Cryptosporidium spp*, *Escherichia coli* F5, rotavírus e coronavírus em episódios clínicos de diarreias neonatais indiferenciadas observados em vitelos no concelho de Odemira.

2. Material e métodos

2.1. Animais-alvo

Neste estudo foram investigadas 33 amostras de fezes provenientes de vitelos com diarreia, acompanhados no período de 25 de Fevereiro de 2010 a 28 de Fevereiro de 2011. Todos os vitelos assistidos tinham menos de um mês de idade e pertenciam a efectivos de boviniculturas de carne localizadas no concelho de Odemira e limítrofes. Todos eles pertenciam à raça bovina Limousine, sendo que o mais novo analisado tinha 3 dias e o mais velho 27. O regime alimentar dos animais era baseado em silagem de milho, trigo e azevém e pastagens.

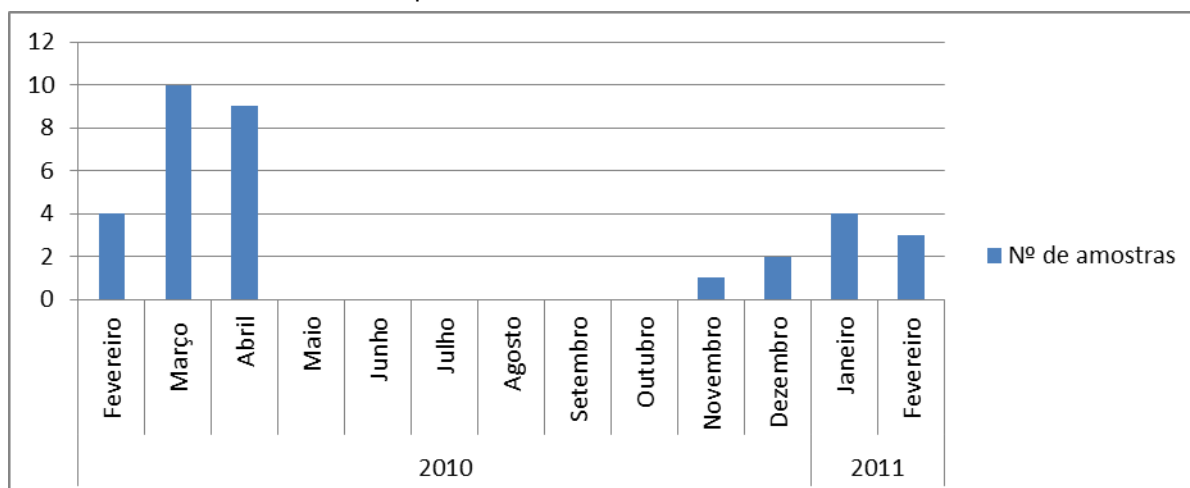
O *timing* do Estágio Curricular foi planeado de forma a coincidir com os períodos de maior frequência de partos e, portanto, de vitelos recém-nascidos.

2.2. Colheita de amostras biológicas

A colheita de amostras de fezes foi efectuada na exploração, através de estimulação rectal e directamente para um recipiente estéril previamente identificado.

As amostras foram mantidas refrigeradas a 4-5° C em caixas de transporte isotérmicas até ao final do dia, altura em que ou era realizada a análise (período de 25/02/10 a 22/04/10, em que decorreu o Estágio) ou as amostras de fezes eram conservadas no frigorífico a 4-5° C para posterior análise (período de 23/04/10 a 28/02/11, extensão do período de recolha de amostras para tentar aumentar a casuística). A calendarização e a frequência de recolhas está ilustrada no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Recolha de amostras por mês do ano



2.3. Diagnóstico laboratorial

Para identificar o agente etiológico foi usado um *kit* de imunoensaio cromatográfico vertical rápido para detecção de antígeno, o *TETRASTRIPS BIO K 156* (Tabela 1), do Laboratório BioX. Cada teste é composto por 4 tiras, uma para cada agente a pesquisar (*Cryptosporidium spp*, *E. coli* F5, rotavírus e coronavírus) e um frasco com um tampão de diluição. Ainda que seja um exame relativamente rápido (leitura da tira no máximo aos 10 minutos), no limite, a detecção dos 4 agentes pode demorar 40 minutos, motivo pelo qual os exames foram realizados ao final do dia, quando o tempo não era uma condicionante.

Tabela 1 – Especificações do kit TETRASTRIPS BIO K 156

Agente	Golden Standart test	Especificidade	Sensibilidade
Coronavírus	RT-PCR	97,4%	63,6%
<i>Cryptosporidium</i>	Técnica de flutuação	95,5%	94,1%
<i>E. coli</i>	PCR	94,4%	82,6%
Rotavírus	Electroforese de dsRNA em gel de poliacrilamida (coloração de prata)	100%	96%

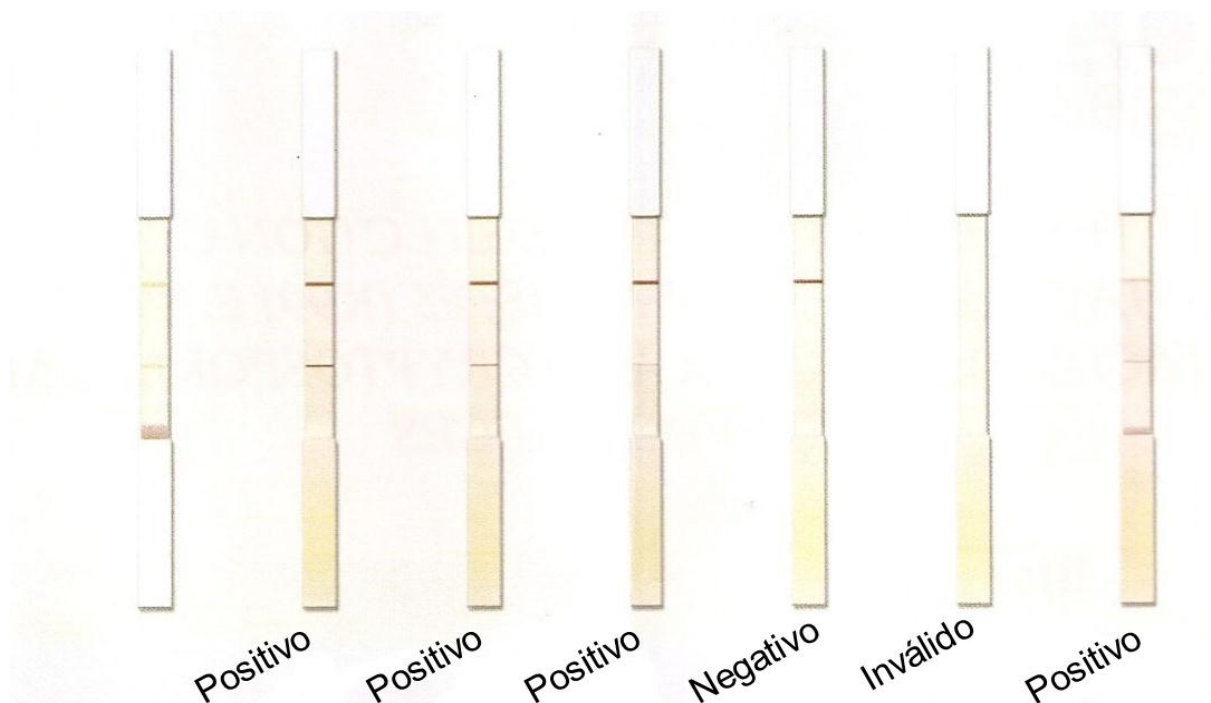
2.3.1. Protocolo de procedimentos do imunoensaio

O protocolo utilizado foi o fornecido pelo fabricante do kit.

Uma amostra de fezes foi recolhida com auxílio da colher fornecida no kit: se a amostra se encontrava em estado líquido era recolhida uma colher cheia, procedendo-se de seguida à diluição no soluto tampão do *kit*; se a amostra se encontrava em estado sólido ou semi-sólido, era colhida uma colher cheia e o excesso de amostra era retirado com um auxílio de uma espátula, sendo posteriormente diluída no líquido diluidor. A amostra foi posteriormente homogeneizada através de movimentos circulares do recipiente. Após homogeneização, foi inserida uma tira no tubo com as setas voltadas para baixo e foi feita a leitura da tira, até 10 minutos no máximo. Após leitura da fita, uma nova fita específica para outro agente etiológico era inserida no recipiente. Um teste era concluído quando as 4 tiras dos diferentes agentes exibissem um de dois resultados: positivo ou negativo.

A interpretação do resultado foi feita com base na chave disponibilizada pelo fabricante (Figura 11): a presença de 2 linhas indica uma amostra positiva; de apenas 1 linha que a amostra é negativa pois só exibe a linha de controlo; se não surgir nenhuma linha, o teste é considerado inválido pois há ausência da linha de controlo que tem que surgir sempre.

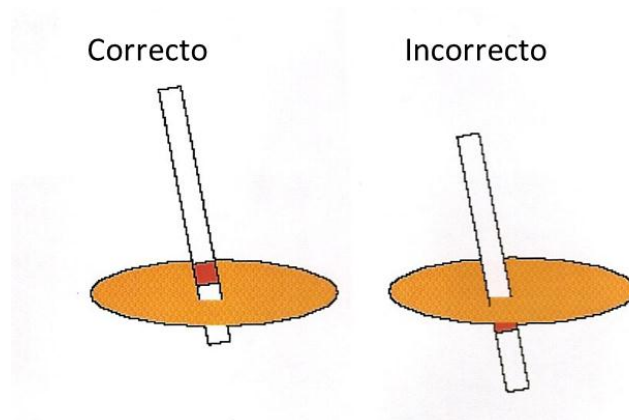
Figura 11 – Interpretação do Kit TETRASTRIPS BIO K 156



Ainda para garantir a boa execução do teste, a linha vermelha de reagente nunca foi submergida no tampão, tal como mostra a Figura 12. Para que isso não acontecesse, as quantidades de amostra (uma colher) foram respeitadas e evitou-se a sobreagitação durante

a homogeneização para não se formar espuma. O teste foi sempre efectuado com luvas pelo Estagiário.

Figura 12 – Posicionamento das tiras



2.3.2. Análise estatística exploratória

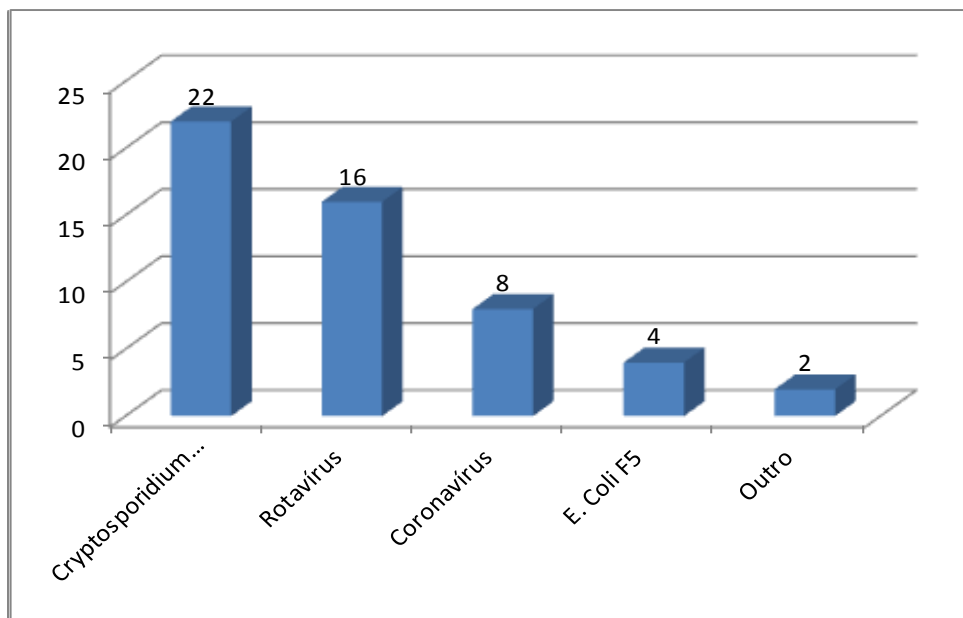
Os resultados foram analisados no programa Epi Info versão 3.51 (13 de Agosto de 2008).

Foram calculadas as frequências dos diversos agentes etiológicos e testadas associações estatísticas através do teste de Qui Quadrado de Mantel-Haenszel quando os resultados eram superiores a 5 e o Teste Exacto de Fischer quando os resultados eram inferiores a 5.

3. Resultados

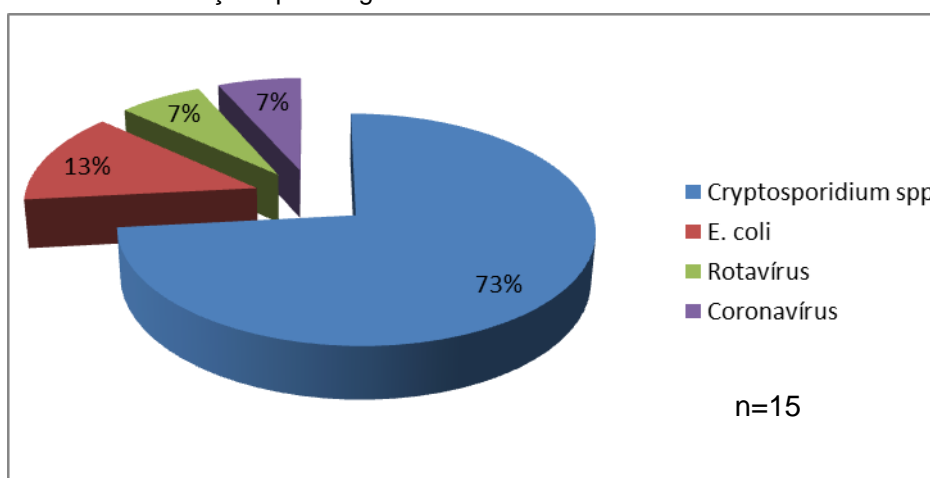
O agente etiológico mais detectado foi o *Cryptosporidium spp* (n=22) seguido pelo rotavírus (n=16). Os agentes menos frequentes foram o coronavírus (n=8) e a *E. coli* F5 (n=4). Duas amostras analisadas revelaram-se negativas aos 4 agentes investigados (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Distribuição de frequências dos agentes pesquisados



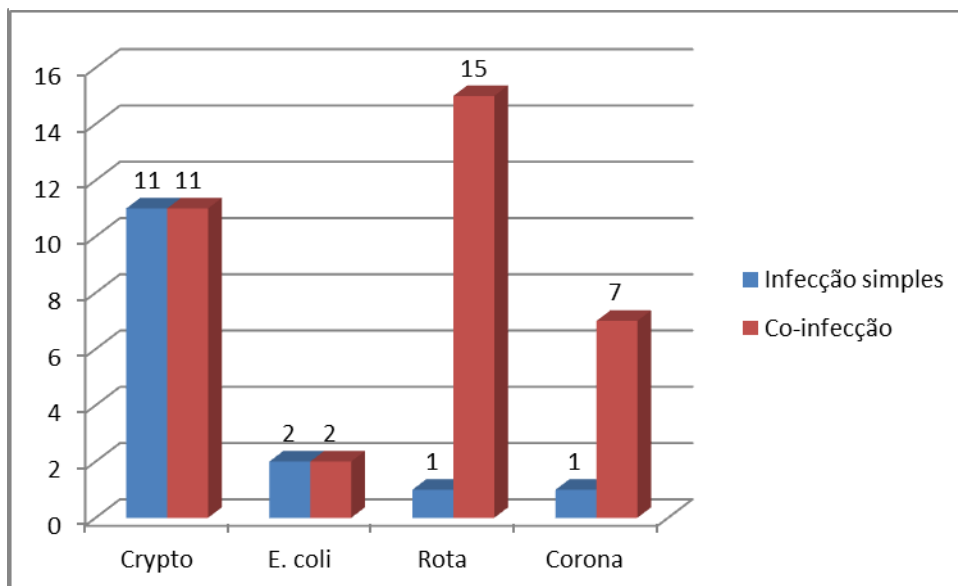
Analisando apenas as infecções simples (n=15), constatamos que foram lideradas pelo *Cryptosporidium spp* (n=11) mas agora seguido pela *E. coli* F5 (n=2). Os rotavírus e os coronavírus tiveram uma frequência de detecção igual (n=1) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Infecções por 1 agente



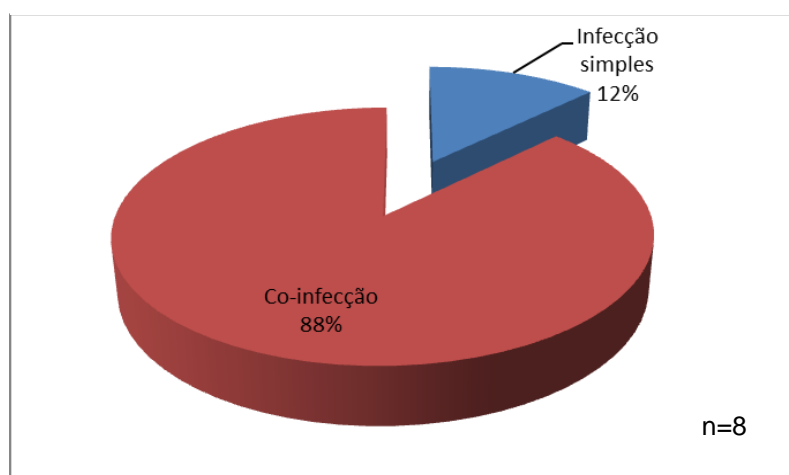
Relativamente à ocorrência de co-infecções observámos uma maior tendência dos vírus para se associarem em co-infecções (Gráfico 8). Já os outros agentes não apresentaram diferenças nas frequências de infecções simples e de co-infecções.

Gráfico 8 – Co-infecções por agente



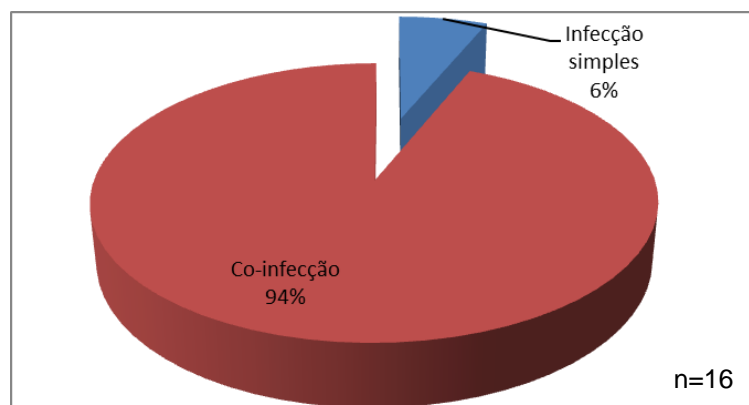
A co-infecção por coronavírus e rotavírus está representada pelos Gráficos 9 e 10, respectivamente.

Gráfico 9 – Infecções e co-infecções envolvendo coronavírus



Comparando as frequências de isolamento do coronavírus quer em co-infecção quer em infecções simples *versus* os restantes agentes isolados (rotavírus + *Cryptosporidium* sp. + *E. coli*) quer em co-infecção quer em infecções simples não se evidenciou associação estatística ($\chi^2=0,18$; $p=0,67$), isto é, na amostra estudada não observámos tendência para o coronavírus surgir associado em co-infecção aquando de episódios clínicos de diarreia neonatal bovina.

Gráfico 10 – Infecções simples e co-infecções envolvendo rotavírus



Comparando as frequências de isolamento do rotavírus quer em co-infecções quer em infecções simples *versus* os restantes agentes isolados (coronavírus + *Cryptosporidium* sp. + *E. coli*) quer em co-infecção quer em infecções simples evidenciámos associação estatística ($\chi^2=7,70$; $p=0,006$), isto é, na amostra estudada (33 vitelos) há uma tendência para o rotavírus surgir associado em co-infecção nos episódios de diarreia neonatal bovina.

As restantes interacções entre os diferentes agentes estão discriminadas na Tabela 2.

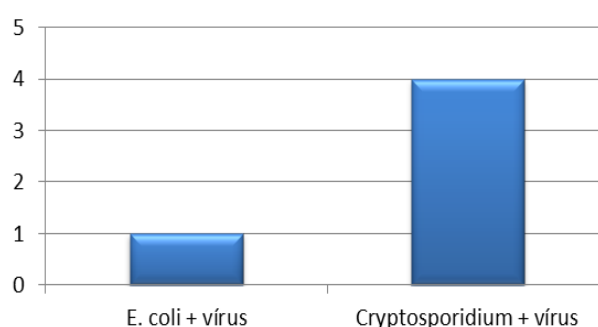
Tabela 2 – Relação entre agentes em co-infecções

AGENTE	<i>E. Coli</i>	<i>Cryptosporidium spp</i>	Rotavirus	Coronavírus
<i>E. coli</i> F5	-	0	2	1
<i>Cryptosporidium</i>	0	-	11	3
Rotavírus	2	11	-	6
Coronavírus	1	3	6	-

Em nenhuma amostra detectámos o *Cryptosporidium spp* e a *E. coli* em co-infecções. No entanto não foi possível aferir estatisticamente quaisquer tendências de co-infecção entre estes dois agentes ($\chi^2=1,40$; $p=0,59$).

Em relação às co-infecções envolvendo a presença de 3 agentes em simultâneo, há a salientar o facto de todos os casos ($n=5$) terem em comum a presença dos dois vírus mais um dos restantes agentes etiológicos: rotavírus + coronavírus + *E. coli* ($n=1$); rotavírus + coronavírus + *Cryptosporidium spp* ($n=4$) (Gráfico 11).

Gráfico 11 – Infecções envolvendo três agentes etiológicos



4. Discussão

As diarreias agudas indiferenciadas dos vitelos recém-nascidos causam uma considerável redução da performance produtiva dos vitelos. Ainda que nas explorações investigadas a taxa de fatalidade causada pelas diarreias neonatais seja muito baixa, o que revela o bom maneio pós-parto praticado nas explorações e a qualidade do desempenho dos médicos veterinários assistentes, a sua ocorrência retarda o crescimento dos vitelos, agravando os custos de produção.

A síndrome diarreia tem uma natureza multifactorial e vários agentes podem estar implicados - às vezes em simultâneo - no mesmo animal/surto. Assim a identificação dos agentes etiológicos torna-se extremamente importante de modo a planear estratégias futuras de prevenção, como por exemplo desparasitações e vacinações, e de controlo, como por exemplo a selecção adequada de antibióticos para fazer face a episódios clínicos de modo mais eficaz.

Neste estudo investigámos quatro agentes etiológicos responsáveis por diarreias neonatais em vitelos com o objectivo de determinar quais os agentes implicados na síndrome, as suas frequências e a eventual ocorrência de co-infecções.

O *Cryptosporidium spp* foi o agente mais isolado (66,7%) quer fruto de infecções simples e de co-infecções. Este resultado não é surpreendente se levarmos em conta que a maioria dos bovinos são portadores assintomáticos deste protozoário. Segundo um estudo recente realizado em quatro herdades do concelho de Odemira, a prevalência de *Cryptosporidium spp* nas fezes de bovinos adultos oscilou entre 70% e 92% nas diferentes herdades (Cardoso, 2010). O aumento de excreção de oocistos no período pré-parto (Ralston et al., 2003) e a permanência do vitelo com a progenitora no mesmo ambiente corroboram para a elevada frequência de *Cryptosporidium spp* registada.

Por outro lado, existe cada vez mais evidência de que a água é um meio importante na disseminação deste agente. De facto, diferentes estudos detectaram a presença de oocistos de *Cryptosporidium spp* em locais de captação de água como os leitos de rios, reservatórios e mesmo na água corrente de vários países (Tsushima et al., 2001; Carmena et al., 2007; Lobo et al., 2009). Sendo o rio Mira e os seus afluentes parte vital do ecossistema do concelho de Odemira, o contacto com águas eventualmente infectadas diversifica a exposição ao agente e aumenta o risco de infecção. Este cenário hipotético agrava-se por muitas explorações pecuárias recorrerem à captação de águas subterrâneas para o abeberamento dos animais e por a chuva promover a infiltração dos oocistos da superfície para cursos de águas subterrâneas (Olson, O'Handley, Ralston, McAllister & Thompson, 2004).

Por sua vez, o processo de ensilagem não elimina totalmente este perigo biológico e pode também contribuir para aumentar a exposição dos vitelos ao *Cryptosporidium spp.* Num estudo efectuado por Merry, Mawdsley, Brooks & Davies (1997), o processo de ensilagem reduziu o número de oocistos devido à utilização de ácido fórmico na acidificação que mitigou a carga parasitária em cerca de 70%. No entanto, os 30% restantes seriam suficientes para induzir infecção, caso a silagem fosse ingerida. O contacto da cultura (milho, azevém, etc.) com adubo animal, solo e águas contaminadas também promove a contaminação da silagem (Merry et al., 1997; Olson et al., 2004).

O cenário epidemiológico identificado neste estudo pode ter impacto zoonótico. O *C. parvum* e o *C. hominis* representam a maioria dos casos de criptosporidiose humana (Xiao, 2010). Apesar dos bovinos serem considerados hospedeiros naturais do *C. parvum*, apenas os vitelos não desmamados tendem a se infectar com esta espécie e são eles que excretam o parasita em maiores quantidades. Após o desmame, os vitelos tendem a infectar-se com *C. bovis* (Xiao & Feng, 2008).

Sendo a zona estudada alvo de deslocações em massa no Verão de jovens amantes de música (Festival Sudoeste na Zambujeira do Mar; TASSJazz Festival em Odemira), servindo nestes eventos, o canal de rega quase como uma praia fluvial e estando o *Cryptosporidium spp* presente no ecossistema, a probabilidade de ocorrência de casos esporádicos/focos no Homem deve ser equacionada. Não encontramos estudos sobre a presença de oocistos nos canais referidos mas esta é uma potencial via de contágio que não deve ser negligenciada pelas autoridades locais de Saúde Pública. É certo que no Verão a época reprodutiva dos bovinos está praticamente no fim e que as excreções do parasita, em particular por parte dos vitelos, são residuais. Porém, já referimos a resistência dos oocistos no meio ambiente, principalmente na água e a temperaturas amenas (Fayer et al., 1998) e o número de oocistos necessários para infectar o ser humano é baixo: $DI_{50}=132$ oocistos, segundo Chappel et al. (1999). Por isso, o desfaseamento temporal entre a época de festivais e o pico de excreção de oocistos de *Cryptosporidium spp* pode não garantir a ausência de exposição a doses infecciosas.

Ainda assim, na vertente zoonótica associada à presença de *Cryptosporidium spp* num ecossistema, julgamos importante recordar a opinião de O'Handley (2007) que sugere que parte dos surtos anteriormente atribuídos ao gado bovino poderão resultar de contaminação humana. As diferenças entre o *C. parvum* e o *C. hominis* só são detectáveis usando técnicas moleculares sofisticadas e os humanos são capazes de disseminar o *C. parvum*. Esta hipótese foi demonstrada após a investigação epidemiológica de surtos epidémicos (O'Handley, 2007).

A frequência de coronavírus detectada neste estudo foi de 24,2%, uma proporção elevada quando comparada com trabalhos de outros Autores. Uhde et al. (2008) calcularam uma prevalência de 7,8%; Mayameei, Mohammadi, Yavari, Afshari & Omidi (2010) de 3,17%; Perez et al. (1998) de 9% e de la Fuente et al. (1999) de 11,1%. Um dos factores que pode ter contribuído para uma eventual sobredetecção de coronavírus é o facto da sensibilidade do *Kit* de imunocromatografia usado ser de 63,6% quando comparada com o RT-PCR (*golden standard*) (Diagnostics, 2011). Isto é, uma proporção considerável dos resultados positivos no teste que realizámos podem corresponder a falso-positivos.

A frequência de rotavírus neste trabalho foi de 48,5%, valor similar ao calculado por Garcia et al. (2000) em Espanha (42,7%) e por Luginbuhl et al. (2005) na Suíça (46%). Juntamente com o *Cryptosporidium spp*, foi o agente mais isolado tal como reportado em Espanha por Garcia et al. (2000).

Num estudo para calcular a prevalência do *Cryptosporidium spp*, de la Fuente et al. (1999) observaram que 87% das co-infecções por *Cryptosporidium spp* envolviam rotavírus. O desenho do estudo foi similar ao de Garcia et al. (2000). Também neste aspecto se registam diferenças relativamente ao nosso estudo pois apenas 50% das co-infecções por *Cryptosporidium spp* envolviam rotavírus.

A frequência de isolamento deste agente em infecções simples foi baixa (6,15%), facto que será aprofundado adiante.

A frequência de detecção de *E.coli* F5 neste estudo foi baixa (12,1%). Este valor encontra-se próximo de trabalhos efectuados noutros países: 7,5% na Inglaterra (Sherwood et al., 1983), 6,1% na França (Naciri, Lefay, Mancassola, Poirier & Chermette, 1999) e 3% e 5,5% na Suíça (Luginbuhl et al., 2005; Uhde et al., 2008). Estes dados sugerem que o envolvimento desta bactéria na diarreia neonatal em vitelos é relativamente baixo. Este cenário não é alheio à forma como são criados os vitelos nas explorações visitadas no concelho de Odemira. As vacas parem no campo, onde a densidade animal é menor, impedindo a sobrepopulação, um dos factores de risco da doença. Outro factor de protecção é o consumo de colostro logo após o nascimento. Por último, o cuidado que as grandes herdades têm em vacinar as mães contra a colibacilose para forneçam aos vitelos um colostro rico em anticorpos específicos contra *E. coli* F5, assegurando a imunidade passiva dos recém-nascidos no período crítico das diarreias.

Não evidenciámos associação estatística entre a detecção de *E. coli* F5 e rotavírus. Ainda assim, a presença desta bactéria em associação com rotavírus e coronavírus foi de 50% e 12,5%, respectivamente. Existem estudos em modelos humanos e animais que demonstram que um dos requisitos para que a *E. coli* enterotoxigénica provoque doença em bebés e em

vitelos maiores que 1 ano é a presença simultânea de rotavírus (Tzipori, Makin, Smith & Krautil, 1981; Snodgrass, Smith & Krautil, 1982; Grimprel, Rodrigo & Desselberger, 2008). Ainda que se deva referir que esta baixa frequência de *E. coli* F5 possa ter resultado de uma amostragem reduzida e de conveniência, não é de subvalorizar o esforço que os produtores têm vindo a fazer para melhorar os níveis de biossegurança das explorações.

Parece haver uma tendência para a ausência de co-infecções por *Cryptosporidium spp* e *E. coli* F5. No entanto, recordamos que este resultado é válido apenas para as explorações investigadas e no período de tempo referido.

As co-infecções representam neste estudo, 48,5% dos casos de diarreia neonatal e tendem a envolver um ou ambos os vírus pesquisados. Inclusive, no caso dos rotavírus, existe uma tendência demonstrada estatisticamente para a sua detecção em co-infecções. Um resultado ainda mais extremo foi detectado num estudo no Brasil, onde todos os isolamentos virais foram verificados em co-infecções (Brandao, Villarreal, Souza, Richtzenhain & Jerez, 2007). Uma possível explicação é o agravamento dos sintomas produzido por co-infecções, com o consequente aumento da intervenção veterinária e do recurso ao diagnóstico laboratorial (Brandao et al., 2007). Além disso, a presença de um agente pode permitir a infecção por outro agente que sozinho não provocaria infecção (Bridger, 1994; Barry, Alfieri, Stipp & Alfieri, 2009).

As elevadas frequências em que detectámos a presença de coronavírus e de rotavírus em co-infecções em episódios de diarreia neonatal bovina no concelho de Odemira, associado à baixa frequência destes em infecções simples também reforça a interpretação de que estes vírus têm um comportamento oportunista na zona, isto é, sozinhos não são capazes de induzir doença, em co-infecção provocam episódios clínicos agudos.

5. Conclusões

Este estudo, realizado no concelho de Odemira sobre as diarreias neonatais de vitelos, confirma que o complexo das diarreias agudas indiferenciadas dos vitelos recém-nascidos tem uma etiologia complexa.

Constatámos que o *Cryptosporidium spp.* e o rotavírus são os agentes etiológicos mais frequentes em episódios de diarreia aguda em vitelos.

Parece existir uma relação directa entre a excreção de oocistos pelas mães e a infecção dos vitelos. Num concelho em que num estudo preliminar foi demonstrada uma elevada excreção de oocistos pelos bovinos adultos, nós verificámos que também nos vitelos diarreicos a excreção é elevada. Não é portanto de excluir que as águas de abeberamento possam representar uma importante fonte de infecção, principalmente dos adultos.

Na vertente de Saúde Pública Veterinária, considerando a elevada frequência de oocistos de *Cryptosporidium spp.* que são excretados pelos diferentes grupos etários de bovinos e a grande afluência de jovens festivaleiros a este concelho no Verão, um cenário de ingestão involuntária de oocistos viáveis durante banhos no rio Mira, seus efluentes e nos canais deve ser investigada.

A frequência de isolamentos de *E. coli* F5 foi baixa, provavelmente fruto da consciencialização que os produtores têm acerca da importância do manejo adequado dos recém-nascidos e do investimento que fazem em recursos e em tempo para o melhorar. Verificámos que metade das detecções de *E. coli* ocorreram em co-infecção com rotavírus. Também no âmbito das co-infecções por *E. coli*, esta bactéria nunca foi detectada junto com *Cryptosporidium spp.*

As co-infecções foram neste estudo perto de 50%. Apresentavam em comum a presença de coronavírus e/ou rotavírus associados a um dos outros agentes etiológicos, nomeadamente *Cryptosporidium spp* (o mais isolado em co-infecções) e a *E. coli*.

Por último, verificou-se que as diarreias de etiologia viral raramente resultam de infecções simples, resultado das baixas frequências que estes revelaram de infecções simples. Parece que os vírus pesquisados, além de frequentes na zona, estão em equilíbrio com o hospedeiro que resulta num estado de infecção subclínico.

Desejaríamos ter aumentado o tamanho da amostra. Com essa intenção alargámos o período de estágio de 6 meses para 1 ano mas mesmo assim só conseguimos acompanhar 33 episódios de diarreia aguda indiferenciada em vitelos. Uma amostra maior daria mais

consistência à interpretação dos dados e poderia, eventualmente, ter proporcionado a evidência de outras associações estatísticas.

Uma linha de investigação futura que julgamos pertinente seria estudar a frequência de oocistos de *Cryptosporidium spp.* na água dos canais e do rio Mira no Verão e monitorizar a frequência de notificação de casos de disenterias humanas. Caso fossem detectados oocistos nestes locais, seria relevante recorrer a técnicas de diagnóstico molecular para confirmar a que espécie pertenciam estes oocistos (*C. parvum* ou *C. hominis*) e para esclarecer o eventual contributo da espécie bovina, e dos vitelos em particular, no ciclo epidemiológico deste parasita no concelho de Odemira.

IV - BIBLIOGRAFIA

- Acres, S. D. (1985). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves: a review." *Journal of Dairy Science* 68(1): 229-256.
- Acres, S. D., J. R. Saunders and O. M. Radostits (1977). "Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves: the prevalence of enterotoxigenic *E. coli*, reo-like (rota) virus and other enteropathogens in cow-calf herds." *Canadian Veterinary Journal* 18(5): 113-121.
- Al-Majali, A. M., E. K. Asem, C. H. Lamar, J. P. Robinson, M. J. Freeman and A. M. Saeed (2000). "Characterization of the interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) with its putative receptor on the intestinal tract of newborn calves." *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 28(2): 97-104.
- al-Majali, A. M., J. P. Robinson, E. K. Asem, C. Lamar, M. J. Freeman and A. M. Saeed (1999). "Age-dependent variation in the density and affinity of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptors in mice." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 473: 137-145.
- Al-Majali, A. M., J. P. Robinson, E. K. Asem, C. Lamar, M. J. Freeman and A. M. Saeed (1999). "Characterization of the interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) with its intestinal putative receptor in various age groups of mice, using flow cytometry and binding assays." *Laboratory Animal Science* 49(3): 254-259.
- Al-Yousif, Y., F. Al-Majhdi, C. Chard-Bergstrom, J. Anderson and S. Kapil (2000). "Development, characterization, and diagnostic applications of monoclonal antibodies against bovine rotavirus." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7(2): 288-292.
- Alenius, S., R. Niskanen, N. Juntti and B. Larsson (1991). "Bovine coronavirus as the causative agent of winter dysentery: serological evidence." *Acta Veterinaria Scandinavica* 32(2): 163-170.
- Angel, J., B. Tang, N. Feng, H. B. Greenberg and D. Bass (1998). "Studies of the role for NSP4 in the pathogenesis of homologous murine rotavirus diarrhea." *Journal of Infectious Diseases* 177(2): 455-458.
- Argenzio, R. A. (1985). "Pathophysiology of neonatal calf diarrhea." *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 1(3): 461-469.
- Argenzio, R. A., J. A. Liacos, M. L. Levy, D. J. Meuten, J. G. Lecce and D. W. Powell (1990). "Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration, and impaired glucose-Na absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs." *Gastroenterology* 98(5 Pt 1): 1129-1140.
- Athanassious, R., G. Marsolais, R. Assaf, S. Dea, J. P. Descoteaux, S. Dulude and C. Montpetit (1994). "Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods." *Canadian Veterinary Journal* 35(3): 163-169.
- Aycan, A. E. a. R. D. (2010). "Prevalence of rotavirus infections in calves with diarrhea in Konya region." *J. Anim. Vet. Adv.* 9(136-138).
- Baker, S. C. (2008). Coronaviruses: Molecular Biology. In Elsevier, *Encyclopedia of Virology*. (3rd Ed). (pp. 554-562) San Diego: Academic Press.

- Ball, J. M., P. Tian, C. Q. Zeng, A. P. Morris and M. K. Estes (1996). "Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein." *Science* 272(5258): 101-104.
- Barry, A. F., A. F. Alfieri, D. T. Stipp and A. A. Alfieri (2009). "Bovine Coronavirus Detection in a Collection of Diarrheic Stool Samples Positive for Group A Bovine Rotavirus." *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 45-49.
- Barwick, R. S., H. O. Mohammed, M. E. White and R. B. Bryant (2003). "Factors associated with the likelihood of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in soil from dairy farms." *Journal of Dairy Science* 86(3): 784-791.
- Bendali, F., H. Bichet, F. Schelcher and M. Sanaa (1999). "Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France." *Veterinary Research* 30(1): 61-74.
- Benureau, Y., J. C. Huet, A. Charpilienne, D. Poncet and J. Cohen (2005). "Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins." *Journal of General Virology* 86(Pt 11): 3143-3151.
- Berchtold, J. (2009). "Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy." *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 25(1): 73-99, vi.
- Bhattacharya, J. and M. K. Chakrabarti (1999). "Binding of *Escherichia coli* heat-stable toxin and rise of guanylyl cyclase activity in the brush-border membranes of rabbit intestinal epithelial cells." *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 17(1): 28-33.
- Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes and B. J. Ruck (1973). "Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis." *Lancet* 2(7841): 1281-1283.
- Blackburn, B. G., J. M. Mazurek, M. Hlavsa, J. Park, M. Tillapaw, M. Parrish, E. Salehi, W. Franks, E. Koch, F. Smith, L. Xiao, M. Arrowood, V. Hill, A. da Silva, S. Johnston and J. L. Jones (2006). "Cryptosporidiosis associated with ozonated apple cider." *Emerging Infectious Diseases* 12(4): 684-686.
- Boileau, M. J. and S. Kapil (2010). "Bovine coronavirus associated syndromes." *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 26(1): 123-146, table of contents.
- Brandao, P. E., L. Y. B. Villarreal, S. L. P. d. Souza, L. J. Richtzenhain and J. A. Jerez (2007). "Mixed infections by bovine coronavirus, Rotavirus and *Cryptosporidium parvum* in an outbreak of neonatal diarrhea in beef cattle." *Arq Inst Biol Sao Paulo* 74: 33-34.
- Bridger, J. C. (1994). "A definition of bovine rotavirus virulence." *Journal of General Virology* 75 (Pt 10): 2807-2812.
- Brook, E. J., C. Anthony Hart, N. P. French and R. M. Christley (2009). "Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* subtypes in cattle in England." *Veterinary Journal* 179(3): 378-382.
- Brunet, J. P., N. Jourdan, J. Cotte-Laffitte, C. Linxe, M. Geniteau-Legendre, A. Servin and A. M. Quero (2000). "Rotavirus infection induces cytoskeleton disorganization in human intestinal epithelial cells: implication of an increase in intracellular calcium concentration." *Journal of Virology* 74(22): 10801-10806.

- Burton, A. J., D. V. Nydam, G. Jones, J. A. Zambriski, T. C. Linden, G. Cox, R. Davis, A. Brown and D. D. Bowman (2010). "Antibody responses following administration of a *Cryptosporidium parvum* rCP15/60 vaccine to pregnant cattle." *Veterinary Parasitology*.
- Buzinaro, M. G., M. L. A. Mistieri, A. A. B. Carvalho, S. I. Samara, L. C. A. Regitano and J. A. Jerez (2003). "Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarréicas de bezerros de corte em sistema semi-intensivo de produção." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55: 266-270.
- Cardoso, J. M. G (2010). "Contribuição para o estudo do parasitismo gastrointestinal e hepático em bovinos de carne em regime extensivo no Concelho de Odemira." Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa
- Carmena, D., X. Aguinagalde, C. Zigorraga, J. C. Fernandez-Crespo and J. A. Ocio (2007). "Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain." *Journal of Applied Microbiology* 102(3): 619-629.
- Carreno, R. A., D. S. Martin and J. R. Barta (1999). "*Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences." *Parasitology Research* 85(11): 899-904.
- Chappell, C. L., P. C. Okhuysen, C. R. Sterling, C. Wang, W. Jakubowski and H. L. Dupont (1999). "Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy adults with pre-existing anti-*C. parvum* serum immunoglobulin G." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60(1): 157-164.
- Chase, C. C., D. J. Hurley and A. J. Reber (2008). "Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response." *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 24(1): 87-104.
- Chen, F., K. Huang, S. Qin, Y. Zhao and C. Pan (2007). "Comparison of viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in potassium dichromate solution and chlorinated tap water." *Veterinary Parasitology* 150(1-2): 13-17.
- Cho, K. O., M. Hasoksuz, P. R. Nielsen, K. O. Chang, S. Lathrop and L. J. Saif (2001). "Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection." *Archives of Virology* 146(12): 2401-2419.
- Chouljenko, V. N., X. Q. Lin, J. Storz, K. G. Kousoulas and A. E. Gorbalenya (2001). "Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia." *Journal of General Virology* 82(Pt 12): 2927-2933.
- Clark, M. A. (1993). "Bovine coronavirus." *British Veterinary Journal* 149(1): 51-70.
- Collins, J. K., C. A. Riegel, J. D. Olson and A. Fountain (1987). "Shedding of enteric coronavirus in adult cattle." *American Journal of Veterinary Research* 48(3): 361-365.
- Crouch, C. F., S. Oliver and M. J. Francis (2001). "Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and *Escherichia coli* F5 (K99)." *Veterinary Record* 149(4): 105-108.
- Current, W. L. and L. S. Garcia (1991). "Cryptosporidiosis." *Clinics in Laboratory Medicine* 11(4): 873-897.

- Daginakatte, G. C., C. Chard-Bergstrom, G. A. Andrews and S. Kapil (1999). "Production, characterization, and uses of monoclonal antibodies against recombinant nucleoprotein of elk coronavirus." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6(3): 341-344.
- de la Fuente, R., M. Luzon, J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, A. Garcia, D. Cid, J. A. Orden, S. Garcia, R. Sanz and M. Gomez-Bautista (1999). "Cryptosporidium and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain." *Veterinary Parasitology* 80(3): 179-185.
- De Waele, V., N. Speybroeck, D. Berkvens, G. Mulcahy and T. M. Murphy (2010). "Control of cryptosporidiosis in neonatal calves: use of halofuginone lactate in two different calf rearing systems." *Preventive Veterinary Medicine* 96(3-4): 143-151.
- Desselberger, U., E. Manktelow, W. Li, W. Cheung, M. Iturriza-Gomara and J. Gray (2009). "Rotaviruses and rotavirus vaccines." *British Medical Bulletin* 90: 37-51.
- Diagnostics, B. "BIO K 288." Acedido em Fev. 3, 2011, Disponível em <http://www.biox.com/Default.aspx?tabid=67&utid=202>.
- Dong, Y., C. Q. Zeng, J. M. Ball, M. K. Estes and A. P. Morris (1997). "The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(8): 3960-3965.
- DuPont, H. L., C. L. Chappell, C. R. Sterling, P. C. Okhuysen, J. B. Rose and W. Jakubowski (1995). "The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers." *New England Journal of Medicine* 332(13): 855-859.
- Eklund, S., M. Jodal and O. Lundgren (1985). "The enteric nervous system participates in the secretory response to the heat stable enterotoxins of *Escherichia coli* in rats and cats." *Neuroscience* 14(2): 673-681.
- Estes, M. K. (2007). Rotaviruses. In D. M. H. Knipe, Peter M., *Fields Virology*. (5th ed). (pp. 1917-1974) Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Estes, M. K. and J. Cohen (1989). "Rotavirus gene structure and function." *Microbiological Reviews* 53(4): 410-449.
- Fayer, R. (2004). "Cryptosporidium: a water-borne zoonotic parasite." *Veterinary Parasitology* 126(1-2): 37-56.
- Fayer, R. (2007). General Biology. In L. Xiao and R. Fayer, *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. (2nd ed.). (pp. 1-42) Boca Raton: CRC Press.
- Fayer, R., U. Morgan and S. J. Upton (2000). "Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification." *International Journal for Parasitology* 30(12-13): 1305-1322.
- Fayer, R., M. Santin, J. M. Trout and E. Greiner (2006). "Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States." *Veterinary Parasitology* 135(2): 105-112.
- Fayer, R., J. M. Trout and M. C. Jenkins (1998). "Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures." *Journal of Parasitology* 84(6): 1165-1169.

Federação Portuguesa de Associação de Suinicultores (2011). Vacinação de Doença de Aujeszky. Acedido em Fev. 4, 2011, disponível em:
http://www.suinicultura.com/index.php?option=com_content&view=article&id=233:vacinacao-doenca-de-aujeszky-&catid=74:sanidade&Itemid=96

Foster, D. M. and G. W. Smith (2009). "Pathophysiology of diarrhea in calves." *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 25(1): 13-36, xi.

Foster, D. M. and G. W. Smith (2009). "Pathophysiology of diarrhea in calves." *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 25(1): 13-36, xi.

Francis, D. H. (2002). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis." *Journal of Swine Health and Production* 10(4): 171-175.

Franck, S. M., B. T. Bosworth and H. W. Moon (1998). "Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves." *Journal of Clinical Microbiology* 36(6): 1795-1797.

Gaastra, W. and F. K. de Graaf (1982). "Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains." *Microbiological Reviews* 46(2): 129-161.

Garber, L. P., M. D. Salman, H. S. Hurd, T. Keefe and J. L. Schlater (1994). "Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 205(1): 86-91.

Garcia, A., J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, J. A. Orden, D. Cid, R. Sanz, M. Gomez-Bautista and R. de la Fuente (2000). "Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 23(3): 175-183.

Garcia, A., J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, J. A. Orden, D. Cid, R. Sanz, M. Gomez-Bautista and R. de la Fuente (2000). "Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 23(3): 175-183.

Giannella, R. A. and E. A. Mann (2003). "E. coli heat-stable enterotoxin and guanylyl cyclase C: new functions and unsuspected actions." *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 114: 67-85; discussion 85-66.

Glaberman, S., J. E. Moore, C. J. Lowery, R. M. Chalmers, I. Sulaiman, K. Elwin, P. J. Rooney, B. C. Millar, J. S. Dooley, A. A. Lal and L. Xiao (2002). "Three drinking-water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland." *Emerging Infectious Diseases* 8(6): 631-633.

Golin-Bisello, F., N. Bradbury and N. Ameen (2005). "STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 289(3): C708-716.

Gookin, J. L., S. K. Nordone and R. A. Argenzio (2002). "Host responses to *Cryptosporidium* infection." *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 16(1): 12-21.

Gookin, J. L., S. K. Nordone and R. A. Argenzio (2002). "Host responses to *Cryptosporidium* infection." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16(1): 12-21.

- Griffiths, J. K., R. Moore, S. Dooley, G. T. Keusch and S. Tzipori (1994). "Cryptosporidium parvum infection of Caco-2 cell monolayers induces an apical monolayer defect, selectively increases transmonolayer permeability, and causes epithelial cell death." *Infection and Immunity* 62(10): 4506-4514.
- Grimprel, E., C. Rodrigo and U. Desselberger (2008). "Rotavirus Disease: Impact of Coinfections." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 27(1): S3-S10 10.1097/INF.1090b1013e31815eedfa.
- Halaihel, N., V. Lievin, F. Alvarado and M. Vasseur (2000). "Rotavirus infection impairs intestinal brush-border membrane Na(+)-solute cotransport activities in young rabbits." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 279(3): G587-596.
- Han, M. G., D. S. Cheon, X. Zhang and L. J. Saif (2006). "Cross-protection against a human enteric coronavirus and a virulent bovine enteric coronavirus in gnotobiotic calves." *Journal of Virology* 80(24): 12350-12356.
- Hasoksuz, M., S. Sreevatsan, K. O. Cho, A. E. Hoet and L. J. Saif (2002). "Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates." *Virus Research* 84(1-2): 101-109.
- Heine, J., J. F. Pohlenz, H. W. Moon and G. N. Woode (1984). "Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with Cryptosporidium species." *Journal of Infectious Diseases* 150(5): 768-775.
- Hirsh, D. C., N. J. MacLachlan and R. L. Walker (2004). Family *Enterobacteriaceae*. In D. C. Hirsh, *Veterinary Microbiology*. (2ed). (pp. 57-60) Ames, Iowa: Blackwell Publishing.
- Holland, R. E. (1990). "Some infectious causes of diarrhea in young farm animals." *Clinical Microbiology Reviews* 3(4): 345-375.
- Howe, A. D., S. Forster, S. Morton, R. Marshall, K. S. Osborn, P. Wright and P. R. Hunter (2002). "Cryptosporidium oocysts in a water supply associated with a cryptosporidiosis outbreak." *Emerging Infectious Diseases* 8(6): 619-624.
- Ijaz, M. K., S. A. Sattar, T. Alkarmi, F. K. Dar, A. R. Bhatti and K. M. Elhag (1994). "Studies on the survival of aerosolized bovine rotavirus (UK) and a murine rotavirus." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 17(2): 91-98.
- Ijaz, M. K., S. A. Sattar, C. M. Johnson-Lussenburg and V. S. Springthorpe (1985). "Comparison of the airborne survival of calf rotavirus and poliovirus type 1 (Sabin) aerosolized as a mixture." *Applied and Environmental Microbiology* 49(2): 289-293.
- Index of Viruses - Coronaviridae (2006). In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA.
- Jaso-Friedmann, L., L. A. Dreyfus, S. C. Whipp and D. C. Robertson (1992). "Effect of age on activation of porcine intestinal guanylate cyclase and binding of Escherichia coli heat-stable enterotoxin (STa) to porcine intestinal cells and brush border membranes." *American Journal of Veterinary Research* 53(12): 2251-2258.
- Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health (2011). Virulence Factors of enterotoxigenic E.coli. Acedido em Mar. 3, 2011. Diponivel em <http://ocw.jhsph.edu/imageLibrary/index.cfm/go/il.viewImageDetails/resourceID/439518CF-0215-70E1-90802B07B89E688D/>

- Jones, S. L. and A. T. Blikslager (2002). "Role of the enteric nervous system in the pathophysiology of secretory diarrhea." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16(3): 222-228.
- Kanno, T., T. Kamiyoshi, R. Ishihara, S. Hatama and I. Uchida (2009). "Phylogenetic studies of bovine coronaviruses isolated in Japan." *Journal of Veterinary Medical Science* 71(1): 83-86.
- Kapil, S., A. M. Trent and S. M. Goyal (1990). "Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves." *Archives of Virology* 115(1-2): 127-132.
- Kapil, S., A. M. Trent and S. M. Goyal (1990). "Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves." *Archives of Virology* 115(1-2): 127-132.
- Khattar, S. and R. Pandey (1990). "A comparison of four methods for detecting rotavirus in faeces of bovine calves." *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 8(1-2): 31-33.
- Kiang, K. M., J. M. Scheftel, F. T. Leano, C. M. Taylor, P. A. Belle-Isle, E. A. Cebelinski, R. Danila and K. E. Smith (2006). "Recurrent outbreaks of cryptosporidiosis associated with calves among students at an educational farm programme, Minnesota, 2003." *Epidemiology and Infection* 134(4): 878-886.
- Kim, Y., P. R. Nielsen, D. Hodgins, K. O. Chang and L. J. Saif (2002). "Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines." *Vaccine* 20(7-8): 1248-1258.
- Kirkwood, C. D. (2010). "Genetic and antigenic diversity of human rotaviruses: potential impact on vaccination programs." *Journal of Infectious Diseases* 202 Suppl: S43-48.
- Krause, W. J., G. L. Cullingford, R. H. Freeman, S. L. Eber, K. C. Richardson, K. F. Fok, M. G. Currie and L. R. Forte (1994). "Distribution of heat-stable enterotoxin/guanylin receptors in the intestinal tract of man and other mammals." *Journal of Anatomy* 184 (Pt 2): 407-417.
- Lai, M. M. C., S. Perlman and L. J. Anderson (2007). Coronaviridae. In D. M. H. Knipe, Peter M., *Fields Virology*. (5th ed). (pp. 1305-1335) Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lake, I. R., F. C. Harrison, R. M. Chalmers, G. Benthams, G. Nichols, P. R. Hunter, R. S. Kovats and C. Grundy (2007). "Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis." *European Journal of Epidemiology* 22(11): 805-811.
- Laurent, F., L. Eckmann, T. C. Savidge, G. Morgan, C. Theodos, M. Naciri and M. F. Kagnoff (1997). "Cryptosporidium parvum infection of human intestinal epithelial cells induces the polarized secretion of C-X-C chemokines." *Infection and Immunity* 65(12): 5067-5073.
- Lee, S. U., M. Joung, D. J. Yang, S. H. Park, S. Huh, W. Y. Park and J. R. Yu (2008). "Pulsed-UV light inactivation of *Cryptosporidium parvum*." *Parasitology Research* 102(6): 1293-1299.
- Lefay, D., M. Naciri, P. Poirier and R. Chermette (2000). "Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France." *Veterinary Parasitology* 89(1-2): 1-9.
- Liu, L., S. Hagglund, M. Hakhverdyan, S. Alenius, L. E. Larsen and S. Belak (2006). "Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene." *Journal of Clinical Microbiology* 44(3): 957-960.

- Lobo, M. L., L. Xiao, F. Antunes and O. Matos (2009). "Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* genotypes and subtypes in raw and treated water in Portugal." *Letters in Applied Microbiology* 48(6): 732-737.
- Lucas, M. L. (2001). "A reconsideration of the evidence for *Escherichia coli* STa (heat stable) enterotoxin-driven fluid secretion: a new view of STa action and a new paradigm for fluid absorption." *Journal of Applied Microbiology* 90(1): 7-26.
- Lucchelli, A., S. Y. Kang, M. K. Jayasekera, A. V. Parwani, D. H. Zeman and L. J. Saif (1994). "A survey of G6 and G10 serotypes of group A bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in ELISA." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 6(2): 175-181.
- Lucchelli, A., S. E. Lance, P. B. Bartlett, G. Y. Miller and L. J. Saif (1992). "Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio." *American Journal of Veterinary Research* 53(2): 169-174.
- Luginbuhl, A., K. Reitt, A. Metzler, M. Kollbrunner, L. Corboz and P. Deplazes (2005). "[Field study of the prevalence and diagnosis of diarrhea-causing agents in the newborn calf in a Swiss veterinary practice area]." *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 147(6): 245-252.
- Lundgren, O. and L. Svensson (2001). "Pathogenesis of rotavirus diarrhea." *Microbes and Infection* 3(13): 1145-1156.
- Mac Kenzie, W. R., N. J. Hoxie, M. E. Proctor, M. S. Gradus, K. A. Blair, D. E. Peterson, J. J. Kazmierczak, D. G. Addiss, K. R. Fox, J. B. Rose and et al. (1994). "A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply." *New England Journal of Medicine* 331(3): 161-167.
- Mainil, J. G., F. Bex, E. Jacquemin, P. Pohl, M. Couturier and A. Kaeckenbeeck (1990). "Prevalence of four enterotoxin (STaP, STaH, STb, and LT) and four adhesin subunit (K99, K88, 987P, and F41) genes among *Escherichia coli* isolates from cattle." *American Journal of Veterinary Research* 51(2): 187-190.
- Martin, S., M. Lorrot, M. A. El Azher and M. Vasseur (2002). "Ionic strength- and temperature-induced K(Ca) shifts in the uncoating reaction of rotavirus strains RF and SA11: correlation with membrane permeabilization." *Journal of Virology* 76(2): 552-559.
- Matthijnssens, J., M. Ciarlet, E. Heiman, I. Arijs, T. Delbeke, S. M. McDonald, E. A. Palombo, M. Iturriza-Gomara, P. Maes, J. T. Patton, M. Rahman and M. Van Ranst (2008). "Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains." *Journal of Virology* 82(7): 3204-3219.
- Mayameei, A., G. Mohammadi, S. Yavari, E. Afshari and A. Omid (2010). "Evaluation of relationship between Rotavirus and Coronavirus infections with calf diarrhea by capture ELISA." *Comparative Clinical Pathology* 19(6): 553-557.
- McNulty, M. S. and E. F. Logan (1983). "Longitudinal survey of rotavirus infection in calves." *Veterinary Record* 113(15): 333-335.
- Mebus, C. A., L. E. Newman and E. L. Stair, Jr. (1975). "Scanning electron, light, and immunofluorescent microscopy of intestine of gnotobiotic calf infected with calf diarrheal coronavirus." *American Journal of Veterinary Research* 36(12): 1719-1725.

- Mebus, C. A., E. L. Stair, M. B. Rhodes and M. J. Twiehaus (1973). "Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent." *American Journal of Veterinary Research* 34(2): 145-150.
- Mebus, C. A., E. L. Stair, M. B. Rhodes and M. J. Twiehaus (1973). "Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent." *Veterinary Pathology* 10(1): 45-64.
- Mebus, C. A., N. R. Underdahl, M. B. Rhodes and M. J. Twiehaus (1969). "Further studies on neonatal calf diarrhea virus." *Proceedings, Annual Meeting of the United States Animal Health Association* 73: 97-99.
- Medical Structural Genomics of Pathogenic Protozoa (2011). Cryptosporidiosis. Acedido em Fev. 12, 2011, disponível em: <http://www.msgpp.org/cryptosporidium.shtml>
- Mendonca, C., A. Almeida, A. Castro, M. de Lurdes Delgado, S. Soares, J. M. da Costa and N. Canada (2007). "Molecular characterization of Cryptosporidium and Giardia isolates from cattle from Portugal." *Veterinary Parasitology* 147(1-2): 47-50.
- Merry, R. J., J. L. Mawdsley, A. E. Brooks and D. R. Davies (1997). "Viability of Cryptosporidium parvum during ensilage of perennial ryegrass." *Journal of Applied Microbiology* 82(1): 115-120.
- Moon, H. W. (1978). "Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172(4): 443-448.
- Morris, A. P., J. K. Scott, J. M. Ball, C. Q. Zeng, W. K. O'Neal and M. K. Estes (1999). "NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca(2+)-mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice." *American Journal of Physiology* 277(2 Pt 1): G431-444.
- Morrison, D. A., S. Bornstein, P. Thebo, U. Wernery, J. Kinne and J. G. Mattsson (2004). "The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa)." *International Journal for Parasitology* 34(4): 501-514.
- Mourad, F. H. and C. F. Nassar (2000). "Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) antagonism on rat jejunal fluid and electrolyte secretion induced by cholera and Escherichia coli enterotoxins." *Gut* 47(3): 382-386.
- Myers, L. L. and P. A. Guinee (1976). "Occurrence and characteristics of enterotoxigenic Escherichia coli isolated from calves with diarrhea." *Infection and Immunity* 13(4): 1117-1119.
- Naciri, M., M. P. Lefay, R. Mancassola, P. Poirier and R. Chermette (1999). "Role of Cryptosporidium parvum as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France." *Veterinary Parasitology* 85(4): 245-257.
- Nagy, B. and P. Z. Fekete (1999). "Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals." *Veterinary Research* 30(2-3): 259-284.
- Naslund, K., M. Traven, B. Larsson, A. Silvan and N. Linde (2000). "Capture ELISA systems for the detection of bovine coronavirus-specific IgA and IgM antibodies in milk and serum." *Veterinary Microbiology* 72(3-4): 183-206.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic Escherichia coli." *Clinical Microbiology Reviews* 11(1): 142-201.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic Escherichia coli." *Clinical Microbiology Reviews* 11(1): 142-201.

- Nweze, E. I. (2010). "Aetiology of diarrhoea and virulence properties of diarrhoeagenic *Escherichia coli* among patients and healthy subjects in southeast Nigeria." *Journal of Health, Population, and Nutrition* 28(3): 245-252.
- O'Handley, R. M. (2007). "Cryptosporidium parvum infection in cattle: are current perceptions accurate?" *Trends in Parasitology* 23(10): 477-480.
- O'Handley, R. M. (2007). "Cryptosporidium parvum infection in cattle: are current perceptions accurate?" *Trends in Parasitology* 23(10): 477-480.
- Ok, M., L. Guler, K. Turgut, U. Ok, I. Sen, I. K. Gunduz, M. F. Birdane and H. Guzelbektes (2009). "The studies on the aetiology of diarrhoea in neonatal calves and determination of virulence gene markers of *Escherichia coli* strains by multiplex PCR." *Zoonoses Public Health* 56(2): 94-101.
- Ollivett, T. L., D. V. Nydam, D. D. Bowman, J. A. Zambriski, M. L. Bellosa, T. C. Linden and T. J. Divers (2009). "Effect of nitazoxanide on cryptosporidiosis in experimentally infected neonatal dairy calves." *Journal of Dairy Science* 92(4): 1643-1648.
- Olson, M. E., R. M. O'Handley, B. J. Ralston, T. A. McAllister and R. C. Thompson (2004). "Update on Cryptosporidium and Giardia infections in cattle." *Trends in Parasitology* 20(4): 185-191.
- Parashar, U. D., J. S. Bresee, J. R. Gentsch and R. I. Glass (1998). "Rotavirus." *Emerging Infectious Diseases* 4(4): 561-570.
- Park, S. J., G. Y. Kim, H. E. Choy, Y. J. Hong, L. J. Saif, J. H. Jeong, S. I. Park, H. H. Kim, S. K. Kim, S. S. Shin, M. I. Kang and K. O. Cho (2007). "Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves." *Archives of Virology* 152(10): 1885-1900.
- Paton, D. J., K. H. Christiansen, S. Alenius, M. P. Cranwell, G. C. Pritchard and T. W. Drew (1998). "Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales." *Veterinary Record* 142(15): 385-391.
- Payment, P. and E. Morin (1990). "Minimal infective dose of the OSU strain of porcine rotavirus." *Archives of Virology* 112(3-4): 277-282.
- Payne, H. R., J. Storz and W. G. Henk (1990). "Initial events in bovine coronavirus infection: analysis through immunogold probes and lysosomotropic inhibitors." *Archives of Virology* 114(3-4): 175-189.
- Pearson, G. R. and E. F. Logan (1983). "The pathology of neonatal enteritis in calves with observations on *E. coli*, rotavirus and *Cryptosporidium*." *Annales de Recherches Veterinaires* 14(4): 422-426.
- Peijian, H. and C. C. Yun (2010). "Mechanisms of the Regulation of the Intestinal Na⁺/H⁺ Exchanger NHE3." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 10 pag.
- Pereira, J. T., A. O. Costa, M. B. de Oliveira Silva, W. Schuchard, S. C. Osaki, E. A. de Castro, R. C. Paulino and V. T. Soccol (2008). "Comparing the efficacy of chlorine, chlorine dioxide, and ozone in the inactivation of *Cryptosporidium parvum* in water from Parana State, Southern Brazil." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151(2-3): 464-473.

- Perez, E., A. Kummeling, M. M. Janssen, C. Jimenez, R. Alvarado, M. Caballero, P. Donado and R. H. Dwinger (1998). "Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilaran, Costa Rica." *Preventive Veterinary Medicine* 33(1-4): 195-205.
- Plutzer, J. and P. Karanis (2009). "Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update." *Veterinary Parasitology* 165(3-4): 187-199.
- Preiser, G., L. Preiser and L. Madeo (2003). "An outbreak of cryptosporidiosis among veterinary science students who work with calves." *Journal of American College Health* 51(5): 213-215.
- Qadri, F., A. M. Svennerholm, A. S. Faruque and R. B. Sack (2005). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention." *Clinical Microbiology Reviews* 18(3): 465-483.
- Quilez, J., E. Torres, R. M. Chalmers, G. Robinson, E. Del Cacho and C. Sanchez-Acedo (2008). "Cryptosporidium species and subtype analysis from dairy calves in Spain." *Parasitology* 135(14): 1613-1620.
- Radostits, O. M., C. C. Gay, K. W. Hinchcliff and P. D. Constable (2007a). Diseases associated with protozoa: Cryptosporidiosis. In Elsevier, *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10th ed). (pp. 1512-1515): Saunders.
- Radostits, O. M., C. C. Gay, K. W. Hinchcliff and P. D. Constable (2007b). Diseases associated with viruses and Chlamydia - I : Viral diseases characterized by alimentary tract signs - Viral diarrhea in calves, lambs, kids, piglets and foals. In Elsevier, *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10th ed). (pp. 1286-1297): Saunders.
- Radostits, O. M., C. C. Gay, K. W. Hinchcliff and P. D. Constable (2007c). Diseases associated with bacteria - III: Diseases associated with *Escherichia coli* - Acute undifferentiated diarrhea of newborn farm animals (particular calves and piglets). In Elsevier, *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10th ed). (pp. 847-851): Saunders.
- Ralston, B. J., T. A. McAllister and M. E. Olson (2003). "Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams." *Veterinary Parasitology* 114(2): 113-122.
- Ramig, R. F. (2004). "Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection." *Journal of Virology* 78(19): 10213-10220.
- Reynolds, D. J. (1983). "Coronavirus replication in the intestinal and respiratory tracts during infection of calves." *Annales de Recherches Veterinaires* 14(4): 445-446.
- Robertson, L. J., A. T. Campbell and H. V. Smith (1992). "Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures." *Applied and Environmental Microbiology* 58(11): 3494-3500.
- Robinson, G., A. L. Thomas, R. G. Daniel, S. J. Hadfield, K. Elwin and R. M. Chalmers (2006). "Sample prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium andersoni* within a dairy herd in the United Kingdom." *Veterinary Parasitology* 142(1-2): 163-167.

- Rolfe, V. and R. J. Levin (1994). "Enterotoxin Escherichia coli STa activates a nitric oxide-dependent myenteric plexus secretory reflex in the rat ileum." *Journal of Physiology* 475(3): 531-537.
- Rolfe, V. E. and R. J. Levin (1999). "Vagotomy inhibits the jejunal fluid secretion activated by luminal ileal Escherichia coli STa in the rat in vivo." *Gut* 44(5): 615-619.
- Runnels, P. L., H. W. Moon and R. A. Schneider (1980). "Development of resistance with host age to adhesion of K99+ Escherichia coli to isolated intestinal epithelial cells." *Infection and Immunity* 28(1): 298-300.
- Saif, L. J. (1990). "A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved?" *Cornell Veterinarian* 80(4): 303-311.
- Saif, L. J. and F. M. Fernandez (1996). "Group A rotavirus veterinary vaccines." *Journal of Infectious Diseases* 174 Suppl 1: S98-106.
- Sanchez-San Martin, C., T. Lopez, C. F. Arias and S. Lopez (2004). "Characterization of rotavirus cell entry." *Journal of Virology* 78(5): 2310-2318.
- Santin, M., J. M. Trout and R. Fayer (2008). "A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age." *Veterinary Parasitology* 155(1-2): 15-23.
- Santin, M., J. M. Trout, L. Xiao, L. Zhou, E. Greiner and R. Fayer (2004). "Prevalence and age-related variation of Cryptosporidium species and genotypes in dairy calves." *Veterinary Parasitology* 122(2): 103-117.
- Santos, N. and Y. Hoshino (2005). "Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine." *Reviews in Medical Virology* 15(1): 29-56.
- Schoenthaler, S. L. and S. Kapil (1999). "Development and applications of a bovine coronavirus antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6(1): 130-132.
- Schwerts, A., P. Hoyois, G. Chappuis, L. Dagenais and P. P. Pastoret (1982). "Propagation of bovine rotavirus by cats and dogs." *Annales de Recherches Veterinaires* 13(4): 303-308.
- Sellers, Z. M., D. Childs, J. Y. Chow, A. J. Smith, D. L. Hogan, J. I. Isenberg, H. Dong, K. E. Barrett and V. S. Pratha (2005). "Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli stimulates a non-CFTR-mediated duodenal bicarbonate secretory pathway." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 288(4): G654-663.
- Sherwood, D., D. R. Snodgrass and G. H. Lawson (1983). "Prevalence of enterotoxigenic Escherichia coli in calves in Scotland and northern England." *Vet Rec* 113(10): 208-212.
- Shin, S. J., Y. F. Chang, M. Timour, T. L. Lauderdale and D. H. Lein (1994). "Hybridization of clinical Escherichia coli isolates from calves and piglets in New York State with gene probes for enterotoxins (STaP, STb, LT), Shiga-like toxins (SLT-1, SLT-II) and adhesion factors (K88, K99, F41, 987P)." *Veterinary Microbiology* 38(3): 217-225.
- Silverlas, C., K. de Verdier, U. Emanuelson, J. G. Mattsson and C. Bjorkman (2010). "Cryptosporidium infection in herds with and without calf diarrhoeal problems." *Parasitology Research*.

- Slapeta, J. (2006). "Cryptosporidium species found in cattle: a proposal for a new species." *Trends in Parasitology* 22(10): 469-474.
- Smith, G. W. (2009). "Treatment of calf diarrhea: oral fluid therapy." *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 25(1): 55-72, vi.
- Smith, H. (2007). Diagnostics. In L. Xiao and R. Fayer, *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. (2nd ed). (pp. 173-207) Boca Raton: CRC Press.
- Smith, H. W. (1965). "The development of the flora of the alimentary tract in young animals." *Journal of Pathology and Bacteriology* 90(2): 495-513.
- Smith, K. E., S. A. Stenzel, J. B. Bender, E. Wagstrom, D. Soderlund, F. T. Leano, C. M. Taylor, P. A. Belle-Isle and R. Danila (2004). "Outbreaks of enteric infections caused by multiple pathogens associated with calves at a farm day camp." *Pediatric Infectious Disease Journal* 23(12): 1098-1104.
- Snodgrass, D. R., M. L. Smith and F. L. Krautil (1982). "Interaction of rotavirus and enterotoxigenic Escherichia coli in conventionally-reared dairy calves." *Veterinary Microbiology* 7(1): 51-60.
- Spagnolo, J. F. and B. G. Hogue (2000). "Host protein interactions with the 3' end of bovine coronavirus RNA and the requirement of the poly(A) tail for coronavirus defective genome replication." *Journal of Virology* 74(11): 5053-5065.
- Stockman, L. J., M. A. Staat, M. Holloway, D. I. Bernstein, T. Kerin, J. Hull, E. Yee, J. Gentsch and U. D. Parashar (2008). "Optimum diagnostic assay and clinical specimen for routine rotavirus surveillance." *Journal of Clinical Microbiology* 46(5): 1842-1843.
- Sturman, L. S., C. S. Ricard and K. V. Holmes (1990). "Conformational change of the coronavirus peplomer glycoprotein at pH 8.0 and 37 degrees C correlates with virus aggregation and virus-induced cell fusion." *Journal of Virology* 64(6): 3042-3050.
- Thompson, R. C., C. S. Palmer and R. O'Handley (2008). "The public health and clinical significance of Giardia and Cryptosporidium in domestic animals." *Veterinary Journal* 177(1): 18-25.
- Tian, P., M. K. Estes, Y. Hu, J. M. Ball, C. Q. Zeng and W. P. Schilling (1995). "The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum." *Journal of Virology* 69(9): 5763-5772.
- Traven, M., L. Bjornerot and B. Larsson (1999). "Nationwide survey of antibodies to bovine coronavirus in bulk milk from Swedish dairy herds." *Veterinary Record* 144(19): 527-529.
- Traven, M., K. Naslund, N. Linde, B. Linde, A. Silvan, C. Fossum, K. O. Hedlund and B. Larsson (2001). "Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV -- comparison with BCV infection in milk-fed calves." *Veterinary Microbiology* 81(2): 127-151.
- Tsushima, Y., P. Karanis, T. Kamada, H. Nagasawa, X. Xuan, I. Igarashi, K. Fujisaki, E. Takahashi and T. Mikami (2001). "Detection of Cryptosporidium parvum oocysts in environmental water in Hokkaido, Japan." *Journal of Veterinary Medical Science* 63(3): 233-236.
- Tyzzer, E. E. (1910). "An extracellular Coccidium, Cryptosporidium Muris (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse." *J Med Res* 23(3): 487-510 483.

- Tzipori, S. and G. Widmer (2008). "A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis." *Trends in Parasitology* 24(4): 184-189.
- Tzipori, S. R., T. J. Makin, M. L. Smith and F. L. Krautil (1981). "Clinical manifestations of diarrhea in calves infected with rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli*." *Journal of Clinical Microbiology* 13(6): 1011-1016.
- Uga, S., J. Matsuo, E. Kono, K. Kimura, M. Inoue, S. K. Rai and K. Ono (2000). "Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan." *Veterinary Parasitology* 94(1-2): 27-32.
- Uhde, F. L., T. Kaufmann, H. Sager, S. Albin, R. Zanoni, E. Schelling and M. Meylan (2008). "Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland." *Veterinary Record* 163(12): 362-366.
- Uhde, F. L., T. Kaufmann, H. Sager, S. Albin, R. Zanoni, E. Schelling and M. Meylan (2008). "Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland." *Veterinary Record* 163(12): 362-366.
- Ungar, B. L. (1990). "Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens." *Journal of Clinical Microbiology* 28(11): 2491-2495.
- van der Heide, R., M. P. Koopmans, N. Shekary, D. J. Houwers, Y. T. van Duynhoven and W. H. van der Poel (2005). "Molecular characterizations of human and animal group A rotaviruses in the Netherlands." *Journal of Clinical Microbiology* 43(2): 669-675.
- ViralZone (2010). Betacoronavirus. Acedido em Fev. 15, 2011, disponível em http://viralzone.expasy.org/all_by_species/764.html
- ViralZone (2011). Rotavirus. Acedido em Fev. 15, 2011, disponível em http://viralzone.expasy.org/all_by_species/107.html.
- Waltner-Toews, D., S. W. Martin and A. H. Meek (1986). "The effect of early calfhood health status on survivorship and age at first calving." *Canadian Journal of Veterinary Research* 50(3): 314-317.
- Ward, R. L., D. I. Bernstein, E. C. Young, J. R. Sherwood, D. R. Knowlton and G. M. Schiff (1986). "Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection." *Journal of Infectious Diseases* 154(5): 871-880.
- Weiglmeier, P. R., P. Rösch and H. Berkner (2010). "Cure and Curse: *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin and Its Receptor Guanylyl Cyclase C." *Toxins* 2(9): 2213-2229.
- Wieler, L. H., G. Sobjinski, T. Schlapp, K. Failing, R. Weiss, C. Menge and G. Baljer (2007). "Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves." *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 120(7-8): 296-306.
- Wolff, M., S. Sattar, O. Adegbunrin and J. Tetro (2005). Environmental survival and microbicide inactivation of coronaviruses. In A. Schmidt, O. Weber and M. Wolff, *Coronaviruses with Special Emphasis on First Insights Concerning SARS*. (pp. 201-212): Birkhäuser Basel.
- Wyatt, C. R., M. W. Riggs and R. Fayer (2010). "Cryptosporidiosis in neonatal calves." *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 26(1): 89-103, table of contents.

- Xiao, L. (2010). "Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update." *Experimental Parasitology* 124(1): 80-89.
- Xiao, L. and Y. Feng (2008). "Zoonotic cryptosporidiosis." *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 52(3): 309-323.
- Yano, T., M. Garcia, D. S. Leite, A. F. Pestana-de-Castro and M. A. Shenk (1995). "Determination of the efficiency of K99-F41 fimbrial antigen vaccine in newborn calves." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 28(6): 651-654.
- Yoder, J. S., C. Harral and M. J. Beach (2010). "Cryptosporidiosis surveillance - United States, 2006-2008." *MMWR Surveillance Summaries* 59(6): 1-14.
- Zadrozny, L. M., S. H. Stauffer, M. U. Armstrong, S. L. Jones and J. L. Gookin (2006). "Neutrophils do not mediate the pathophysiological sequelae of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal piglets." *Infection and Immunity* 74(10): 5497-5505.
- Zhang, M., C. Q. Zeng, A. P. Morris and M. K. Estes (2000). "A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells." *Journal of Virology* 74(24): 11663-11670.
- Zhang, X. M., W. Herbst, K. G. Kousoulas and J. Storz (1994). "Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child." *Journal of Medical Virology* 44(2): 152-161.
- Zhu, G., J. S. Keithly and H. Philippe (2000). "What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*?" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 Pt 4: 1673-1681.